ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 18 Fascicule 2 1997



PUBLICATION TRIMESTRIELLE

Juillet 1997

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 18 FASCICULE 2 1997

CONTENTS

Cryptogamie, Mycol. 1997, 18 (2) : 95-172

SFM

Société Française de Microbiologie
28 rue du Docteur Roux - 75724 Paris cedex 15.
Tél : 01 45 68 81 79

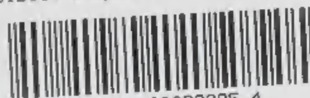
Section de Mycologie

23-24 Janvier 1997

Faculté de Pharmacie
Lyon

REUNION DU RESEAU DE MYCOLOGIE

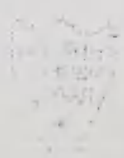
Programme et résumés des communications et affiches



Les articles du fascicule 18(2) sont issus des communications présentées lors du colloque organisé conjointement par la section de Mycologie de la Société Française de Microbiologie et par le Réseau de Mycologie.

Contents of vol. 18(2) represents communications delivered at the meeting jointly organised by the Mycological section of the French Society of Microbiology ant the Mycology Network.

Les articles de ce fascicule n'ont pas été soumis au comité de lecture avant publication.
Articles presented in this issue were not reviewed by referees.



Cryptogamie, Mycol. 1997, 18 (2): 95-109

RECENT ADVANCES IN ECOLOGY AND SYSTEMATICS OF MORELS.

Daniel WIPF[1], Stephanie KOSCHINSKY[2], Philippe CLOWEZ[3], Jean Charles MUNCH[2+], Bernard BOTTON[1] and François BUSCOT[2]

[1]Université Henri Poincaré, Laboratoire de Biologie Forestière, Unité de Physiologie Mycorhizienne, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France.
wipf@scbiol.u-nancy.fr
[2]Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany
[3]46, rue Jeanne d'Arc, F-60400 Suzoy, France
[+]Present address: Institut für Bodenökologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg Postfach 1129, D-85758 Oberschleißheim, Germany

RÉSUMÉ — Le présent article fait la synthèse des avancées récentes dans le domaine de la biologie et de l'écologie des morilles avant de présenter des résultats nouveaux, susceptibles, d'éclairer le débat sur la notion d'espèce dans ce groupe dont la systématique est controversée. Des expériences de confrontations menées avec différentes "espèces de morilles" montrent que l'association à une plante supérieure peut être spécifique. Cependant, le fait que des facteurs bactériens puissent modifier la nature de telles associations incite à une utilisation prudente de telles spécificités d'association comme critère de caractérisation des espèces de morilles. Parmi les approches modernes, c'est l'analyse de l'espaceur ITS de l'ADN ribosomal qui est la mieux adaptée à cette caractérisation et à la révision systématique des *Morchellaceae*. Des exemples sont fournis au sein du groupe des morilles rondes.

ABSTRACT — The paper summarises recent advances in the field of the biology and ecology of morels and presents new results aiming to highlight the species definition in this group with controversial systematics. Experiments using different morel species show that the association with plants can be specific. However, as bacteria may modify their nature, the specificity of the associations must be used cautiously as criterion to characterise morel species. Within the modern approaches, the analysis of the ITS-region appears as the most adapted to characterise true species and to revise the systematics of the *Morchellaceae*. Examples within the group of the yellow morels are given.

KEY WORDS: *Morchella*, ecology, systematics, associations with plants, review

MOTS CLES: *Morchella*, écologie, systématique, associations avec des plantes, revue

Morels are often one of the first spring edible mushrooms collected in temperate regions (Weber, 1995). The stipitate mitrate ascomata with folded to spongiform hymenium make the genus *Morchella* easy to define (Chadefaud, 1960). In contrast, the fact that Korf (1973) and Jacquetant (1984) distinguished respectively 3 and 28 species illustrates



the debatable species definition. The basic difficulty here is that within each taxon, the ascomata display high macroscopic morphological variations (fig. 1), whereas the microscopical features of the hymenium are remarquably homogenous within all *Morchellaceae*. In this context, Gessner (1995) recently underlined the importance to consider also biological and ecological features in order to distinguish form variations respectively reflecting ecotypes and true species. The present article constitutes an attempt to follow this line of thought. A review of known biological and ecological features and the presentation of new results on the specificity of associations between morels and plants will be used to highlight the most recent advances on systematics of this fungal group which base on molecular biological investigations.

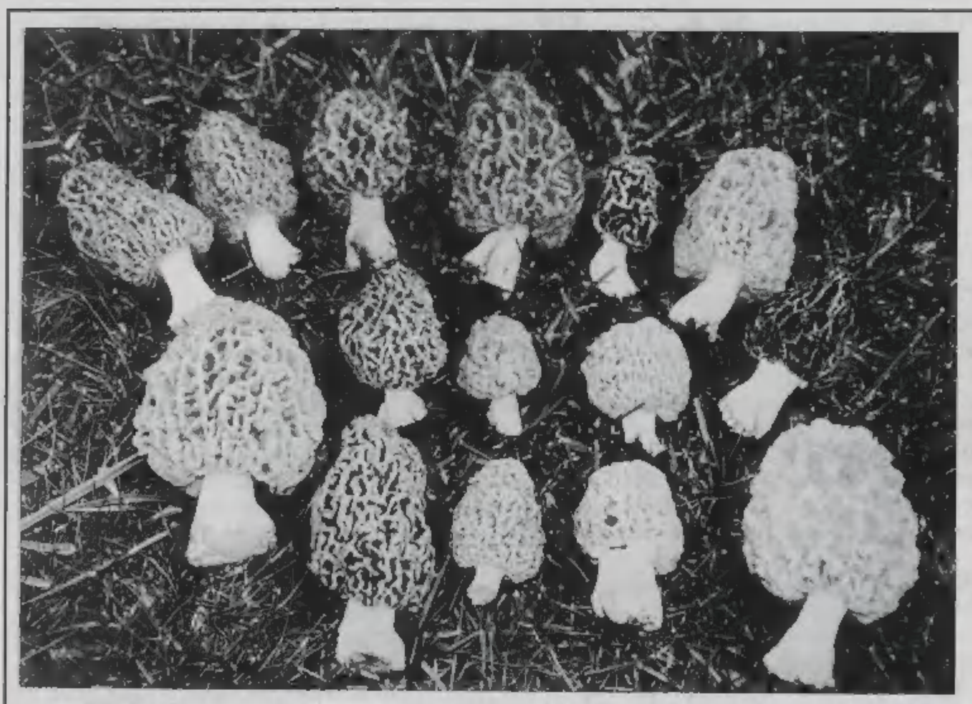


Fig. 1. — Morphological variability of fruitbodies within the taxon *Morchella vulgaris*.

BIOLOGICAL AND ECOLOGICAL CYCLES

The observation by Molliard (1905) and Matruchot (1909) that morels fruit at the expense of preformed sclerotia constituted a crucial step of the ancient effort to elucidate morel biology and ecology. The central biological role of sclerotia was confirmed by the experimental work of Ower (1982 & 1986), which resulted in mastering the fructification under culture conditions. In addition, ecophysiological field investigations allowed Buscot (1989) to demonstrate the biennial life cycle of morels in temperate regions and revealed that sclerotia constitute the mycelial structure which overlives the cold season and provides the nutrients for the ascomata development in early spring. Both latter functions of sclerotia were confirmed by biochemical (Buscot & Bernillon, 1991) and experimental ecophysiological investigations (Buscot, 1993), which also supported the observation by Mayr (1982) that morels form two types of sclerotia. The first type represents the storage and overlive structure described above, while the second one can be considered as abortive ascomatal primordia.

A second crucial step in the elucidation of morel biology was the hypothesis by Hervey *et al.* (1978) and its confirmation by Volk and Leonard (1989) that the mycelium can become heterokaryotic after forming vegetative anastomoses. In their representation of the life cycle (fig. 2), the latter authors considered that only sclerotia formed by such heterokaryotic mycelium, which they termed secondary mycelium, are able to produce ascomata (Volk & Leonard, 1990). Buscot (1993) showed that heterokaryons are being formed under low nutrient availibility, while monosporal strains segregate when cultivated on nutrient rich media. He related this duality of mycelial somatic interactions with the two ecological strategies (see fig. 3) which morels show in nature (Buscot, 1992a). Within the so called "pioneer strategy", morels behave as ruderal organisms, colonising temporary recently disturbed soils on which they display a high fructification abundancy (Kaul, 1975; Turnau, 1984, 1987; Carpenter *et al.*, 1987; Duchesne & Weber, 1993). In the so called "perennial strategy", they grow in stable ecosystems over several years and form fruitbodies only sparsely. Considering the effective nutrient availability in both ecological situations, Buscot (1992a) hypothesised that non self incompatibility between monosporal mycelial strains should be enhanced in the pioneer strategy, while heterokaryons should predominate in the perennial strategy. He related the homokaryotic stage with the saprotrophic nutrition in the pioneer strategy and respectively the heterokaryon formation with the capability to form trophic associations with plant roots in the perennial strategy (see below association with roots). Thus, as is summarised in figures 2 and 3, Volk and Leonard (1990) considered heterokaryosis from the point of view of its role for the reproductive cycle, while Buscot regarded it as a somatic feature allowing the fungus to adapt to an ecological situation marked by enhanced competition for nutrient and complex associations with other organisms.

Additionally to describing morel sclerotia, Molliard (1905) also established a link between the anamorph *Costantinella cristata* and the conidial stage of *Morchella elata*. Paden (1972) confirmed this observation and Gams (pers. communication) obtained conidia of *M. elata* in pure culture. Thus, this feature can be considered as well established. To our knowledge however, *M. elata* is the only morel taxon in which conidia were described and as conidial germination has never been reported, their biological function remains unclear. This conidial stage has been included in the biological life cycle proposed by Volk and Leonard (1990, see fig. 2).

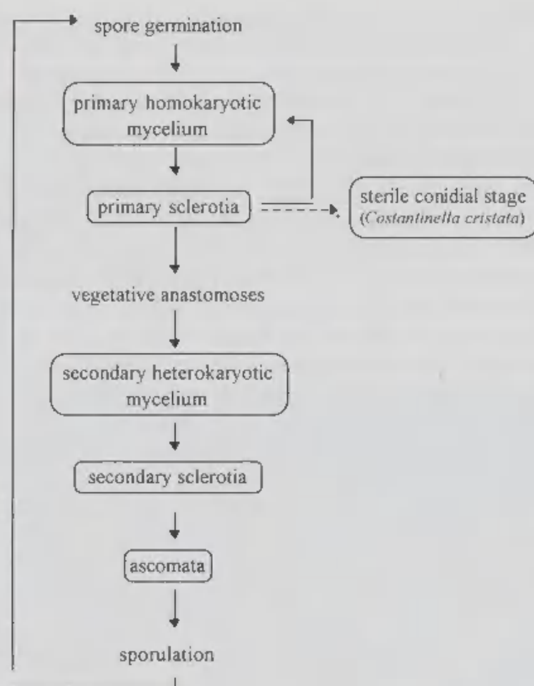


Fig. 2. — Biological life cycle of morels according to Volk and Leonard (1990).

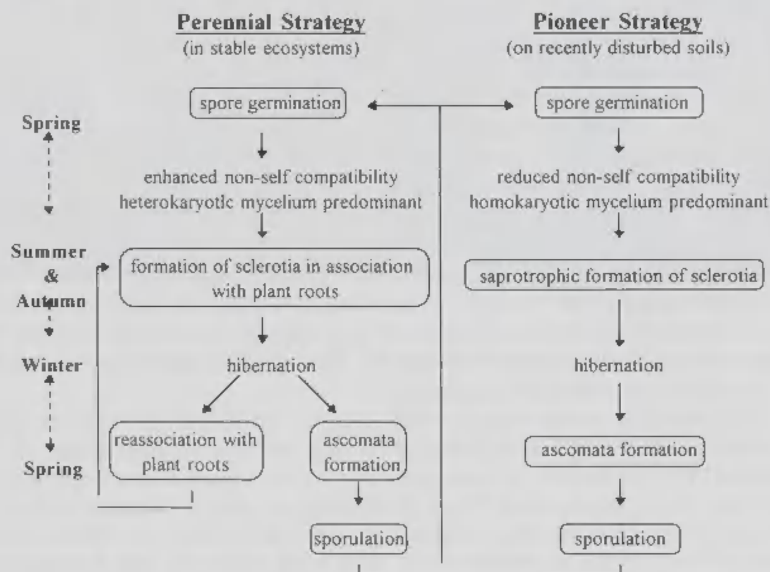


Fig. 3. — Biological and ecological life cycle of morels according to Buscot (1992).

ASSOCIATIONS WITH HIGHER PLANTS IN NATURE

The morel fidelity to vegetation types and to particular plant species is well known by morel hunters and is well documented (table 1). This feature was also largely used for species characterisation by authors such as Jacquetant (1984), who distinguishes a great number of taxa in morels. For example, within the yellow morels (*sectio adnatae* sensu Jacquetant), an association with sand dune vegetation is a crucial characteristics to identify *M. spongiola var. dunensis* (Romagnesi, 1963) and respectively, an occurence in a ash tree forest is a helpful even if not a definitive criterion to characterise *M. vulgaris* (Clowez, 1992). Nevertheless, several of the described associations of morels with plants have to be interpreted cautiously for two reasons. Firstly, within mixed vegetation types, the exact connection to a specific plant species was often not verified. Secondly, the nature of the associations was mostly not investigated. In certain cases however, connections between ascomata and plant roots or rhizomes could be traced and the kind of association characterised. The spectrum of such thoroughly characterised associations appeared to range from parasitism to ectomycorrhizal symbiosis (tab. 2). In the latter case, field observations suggest that the mycorrhizal formation occurs in spring at the same time as fruiting (Buscot & Kottke, 1990; Buscot, 1994) and represents the beginning of a new vegetative cycle within the perennial strategy (Buscot 1992a).

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS ON ASSOCIATIONS WITH PLANTS

While the potential to parasitism was confirmed experimentally, the formation of true mycorrhizas under controlled conditions was not successfull until now (Buscot, 1992b). Nevertheless, with seedlings of *Picea abies*, the author obtained formation of mycorrhiza-like modified short rootlets after inoculation of *M. esculenta* precultivated on a nitrogen rich medium which also enhanced the proliferation of two bacteria (*Bacillus circulans* and *Acinetobacter johnsonii*), probably originating from the spore surface (Fig. 4). Complementary assays to highlight these results are presented here briefly.

First series of assays were performed in a gnotobiotic culture system in which axenic root systems of Norway spruce seedlings were confronted with homo- or hetero-karyotic strains of *M. esculenta* and/or the bacteria isolates mentioned above (for the method, see Buscot 1992 b). The experiments showed clearly that only the morel is able to induce root modifications, as control plants and plants inoculated only with the bacteria never formed modified roots. In all assays inoculated with morel strains, the formation of mycorrhiza-like modified short roots with generally limited growth was induced (fig. 5a & c). In few cases, the modified roots displayed a prolonged growth, which confered a club-shape to them (fig. 5a). Co-inoculation with the morel and the bacteria appeared to enhance this latter event (fig. 5b & d). Furthermore, confirming the above mentioned hypothesis of a link between heterokaryosis and the capability of association with roots in nature (Buscot, 1992 a), the production of both mycorrhiza-like and club-shaped roots was clearly higher in case of inoculation with a heterokaryotic than with a monosporal strain (fig. 5). The clearest morphological effect was obtained with polysporal inoculates (fig. 4).

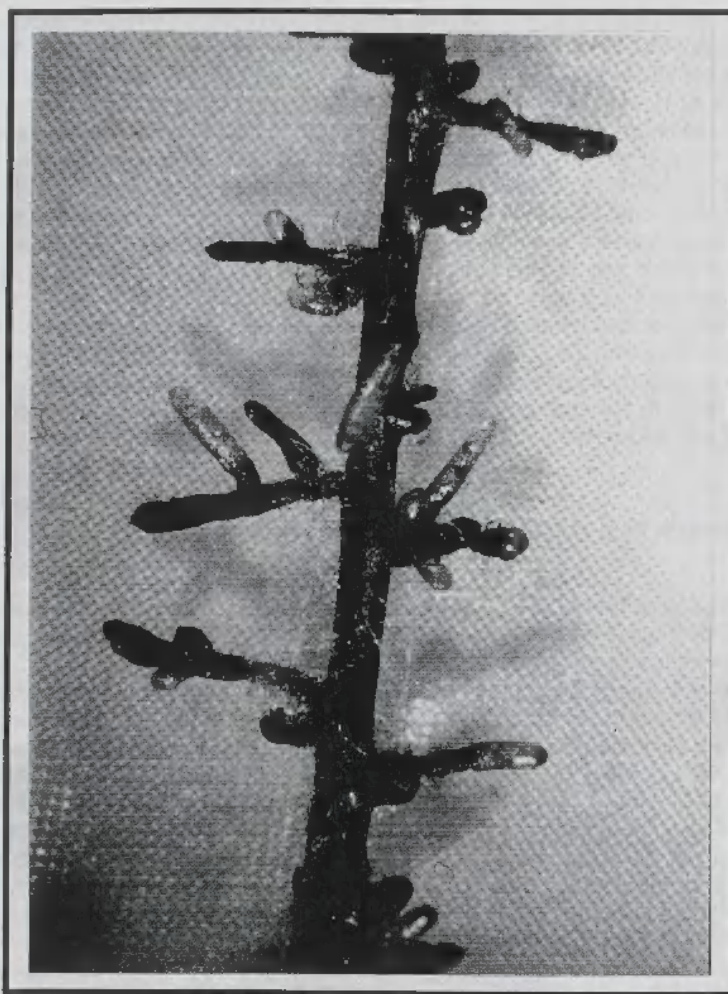


Fig. 4 — Mycorrhiza-like modified short roots of a Norway spruce seedling (*Picea abies*) infected with a polysporal inoculate of *Morchella esculenta*

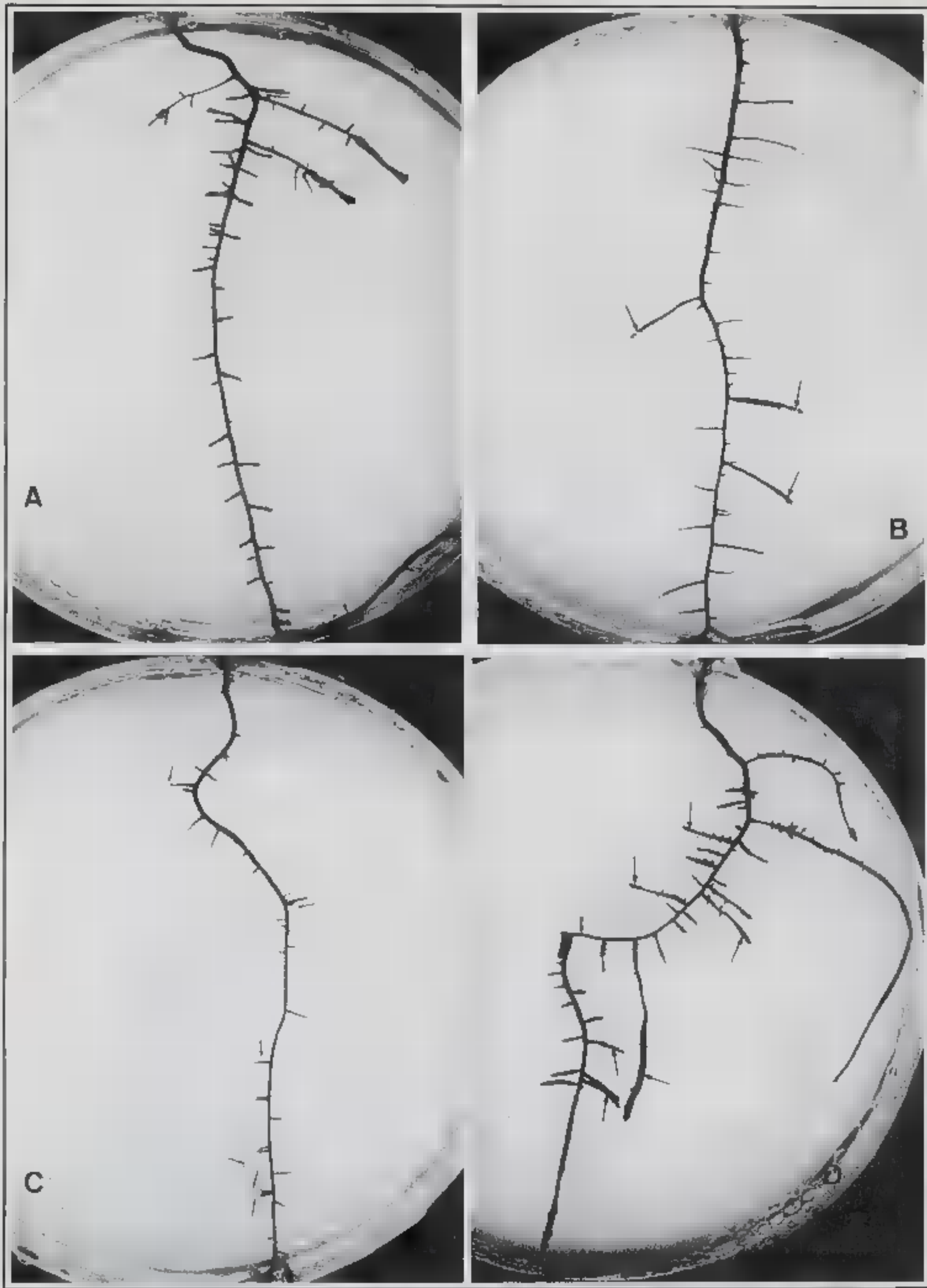


Fig. 5. — Root systems of Norway spruce seedlings inoculated with *Morchella esculenta* and eventually with *Bacillus circulans* and *Acinetobacter johnsonii*. a, single inoculation with a monosporal morel strain; b, dual inoculation with a monosporal fungal strain and with the bacteria; c, single inoculation with a heterokaryotic morel strain; d, dual inoculation with ■ heterokaryotic morel strain and with the bacteria (small arrows, mycorrhiza-like modified short roots with limited growth potential; large arrows, club-shap modified rootlets with prolonged growth potential).

Additional experiments were also performed to assess the specificity of different morels to plant species. Surface sterilised seeds of *Pinus banksiana* Lamb. and *Betula pendula* Roth. were germinated and precultivated on peat during 5-6 weeks in a growth chamber (photoperiod, 16/8 h; light intensity, 80 mmol m^{-2} s^{-1}; temperature, 24°C). They were inoculated with a mix of *Morchella esculenta* and *Morchella elata* and grown for 8-10 weeks. In comparison with control plants, the inoculated birches exhibited reduced shoot but a similar root development (data not shown). In contrast, in pine assays, the effects of the inoculation were higher, as both shoot and root development were reduced (fig. 6).

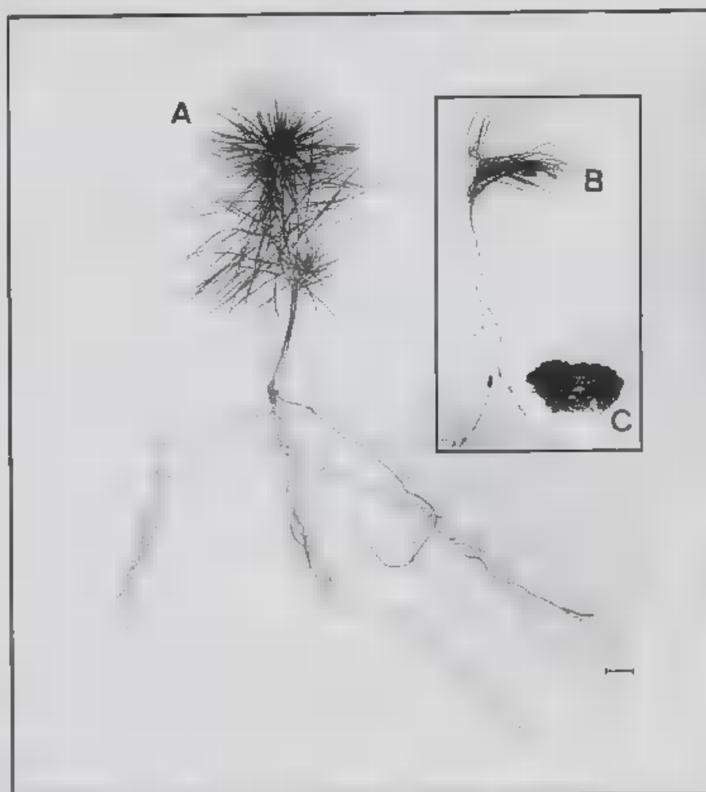


Fig. 6. — Confrontation assay between *Pinus banksiana* and a *Morchella esculenta* + *M. elata* mix. A, control plant; B, inoculated plant; C, sclerotia formed close to B roots. Scale bar represents 1 cm.

The kind of the interaction with the roots was also different according to the plant partner. Dense mycelial masses formed around root sectors of the birch trees (fig. 7), whereas large sclerotia formed close to, but not in direct contact with, the pine roots (fig. 6). With either of the plant species, a direct penetration of root tissues by the fungus could not be detected, but the remarkable number of dead plants at the end of the assays suggests a kind of necrotrophic parasitism of the fungus. Using PCR techniques described in the following section, it was possible to demonstrate that from the mixed inoculates, only *M. esculenta* developed in presence of birchs, and respectively that only *M. elata* grew in

presence of the pines (fig. 8). In additional control assays without plants, the mixed inoculum displayed a very reduced growth in the peat substrate used for the assays. Thus, this second series of experiments demonstrates clearly that morel species need a compatible plant partner to colonise certain kinds of substrates.

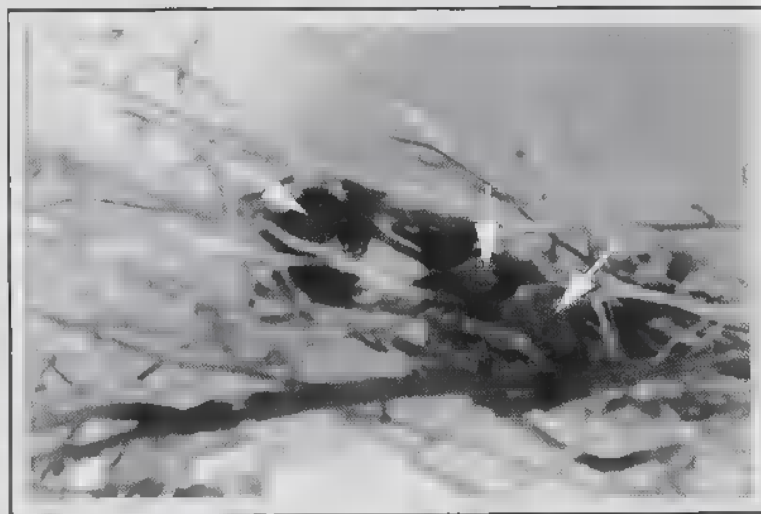


Fig. 7. — Detailed view of birch roots with dense mycelial masses formed by *Morchella elata* (white arrows).

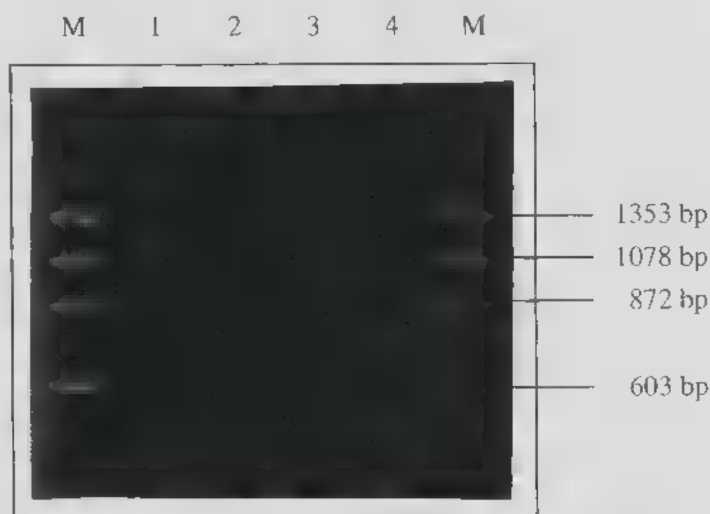


Fig. 8. — Agarose electrophoresis gel of the rDNA spacer ITS of *Morchella esculenta* (1), *M. elata* (2), the mycelial masses formed around root sectors of the birches (3) and of the large sclerotia formed close to *Pinus banksiana* roots (4). M = fragment size markers fX 174 digested by Hae III.

In summary, the above experimental investigations firstly reinforce the hypotheses emitted by Buscot (1992a and 1993), that associations of morels with plants are crucial in the perennial ecological strategy observed in stable ecosystems and that heterokaryosis is an advantage for the fungus in this situation. Secondly, the experiments implied that not only the associations but also their nature could be specific and depend on the taxa of both partners. *M. esculenta* formed a different kind of association with the Norway spruce than with the birch and none with *P. banksiana* with which *M. elata* in turn formed a third kind of association. However, the experiments with the bacteria also demonstrate that the features of the associations can be modified by other biological factors. This suggests that using the associations with plants as a criterion for determination and as an element helping to clear the morel systematics must be done cautiously and in combination with further criteria.

LINK WITH THE SYSTEMATICS

In recent years the potential of modern biological methods to improve the morel systematics was assessed by several authors.

The isozyme polymorphism was used by Gessner *et al.* (1987) and Yoon *et al.* (1990) to characterise geographic isolates of *Morchella esculenta* from North America. Kulkarni and Kamerath (1989), Royse and May (1990) also compared different American *Morchella* species by this method. Finally, Wipf *et al.* (1996a) assessed whether isozyme polymorphism in different members of the *Morchellaceae* could be used to clarify the systematics of the familly. The analysis by the different authors allowed fine discriminations at the inter — or intraspecific levels and appeared useful in strain characterization. However, Wipf *et al.* (1996a) underlined that the exhibited polymorphism is not adequate to perform phylogenetic analysis or to clear the species concept.

The large subunit of the rDNA of *Morchellaceae* was also analysed with PCR/RFLP by Bunyard *et al.* (1994). However, the authors reported higher degrees of polymorphism between intraspecific populations than among putative species in certain cases, which illustrates further the difficulty to define species in morels. In a more recent paper, Buscot *et al.* (1996) showed that polymorphism of the internal transcribed (ITS) spacer of ribosomal DNA is more adequate to clarify morel systematics. The analysis allowed to differentiate clearly all genera in the *Morchellaceae* and confirmed both species groups recognised in all classifications, i.e. black (*sectio distantes*) (Jacquetant, 1984; Weber, 1995) and yellow morels (*sectio adnatae*), which exhibited respective ITS lengths of 740-750 and 1150-1220 bp, respectively (fig 9). Sequence analysis of the ITS region confirmed this high genetical distance between black and yellow morels (Wipf *et al.* 1996b), further suggesting that they should perhaps be considered as distinct genera, as *Mitrophora* is. Within each "genera", slight length variations and different restriction profiles of the ITS region allowed to separate several species (fig. 9).

At present, the performed molecular biological analysis reinforce the validity of taxa like the yellow morels *M. spongiola var dunensis* and *M. hortensis* which do not exhibit remarquable typological criteria but are well characterisable by their specific ecology. In contrast, the distinction between *M. esculenta* and *M. vulgaris* proposed by Clowez (1992), on the basis of ecological features is not confirmed by the molecular biological analysis (data not shown).

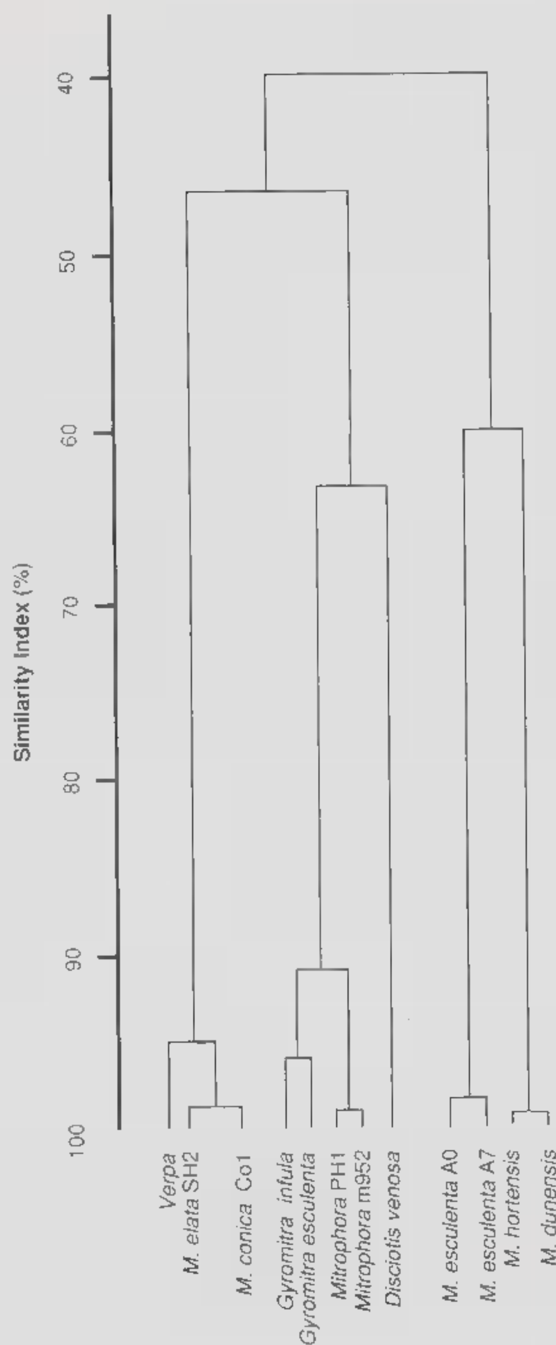


Fig. 9. — Similarity relationships of some *Morchellaceae*. UPGMA tree (Sneath and Sokal, 1973) constructed with the computer program WinCam 2.0 (PC).

Plants		References
Equisetaceae		
	Equisetum hiemale	Buscot & Roux, 1987
Polypodiaceae		
	(species not given)	Lakhanpal *et al.*, 1990
Pinaceae		
	Abies alba, Pinus banksiana, Picea abies	Jacquetant, 1984; Duchesne & Weber, 1993; Buscot & Roux, 1987; Clowez & Wipf, 1997
Magnoliaceae		
	Magnolia sp.	Clowez & Wipf, 1997
Fagaceae		
	Fagus sylvatica, Quercus sp.	Jacquetant, 1984; Buscot & Roux 1987
Betulaceae		
	Betula sp., Carpinus betulus, Alnus sp.	Jacquetant, 1984
Corylaceae		
	Corylus avellana	Jacquetant, 1984, Buscot & Roux, 1987
Ulmaceae		
	Ulmus miror, Celtis australis	Jacquetant, 1984; Buscot & Roux, 1987; Clowez & Wipf, 1997
Rosaceae		
	Prunus avium; Prunus spinosa; Crataegus monogyna, Rubus fruticosus, Malus pumila, Pyrus communis	Clowez and Wipf, 1997; Buscot & Roux, 1987; Philippoussis & Balis, 1995; Jacquetant, 1984
Fabaceae		
	Robinia pseudioaccacia	Philippoussis & Balis, 1995
Aceraceae		
	Acer pseudoplatanus	Clowez & Wipf, 1997
Cornaceae		Buscot & Roux, 1987
	Cornus sanguinea	
Apiales		
	Hedera helix	Clowez & Wipf, 1997
Vitaceae		
	Vitis vinifera	Condamy & Cornu, 1878
Salilicicaceae		Jacquetant, 1984; Clowez and Wipf, 1997
	Populus nigra	
Oleaceae		
	Fraxinus excelsior, Ligustrum vulgare, Olea europaea . Syringa vulgaris	Robert, 1865; Jacquetant, 1984; Buscot & Roux; Clowez & Wipf, 1997
Asteraceae		
	Cynara scolymus, Helianthus tuberosus, Hieracium murorum, Taraxacum sp	Jacquetant, 1984; Buscot & Roux, 1987
Liliaceae		
	Allium ursinum	Buscot & Roux, 1987
Buddlejaceae		
	Buddleja	Clowez & Wipf, 1997

Table 1 — Listing of plant species near which occurence of morels have been reported.

Morel species	Associated plants	Observations	Références
M. esculenta	*Vitis vinefera*	Parasitism	Condamy & Cornu, 1878
M. esculenta	*Oleaceae; Cornaceae*	Parasitism	Robert, 1865, Buscot & Roux, 1987
M. esculenta	*Helianthus tuberosus*	Parasitism	Roze, 1883
M. spongiola	*Poacea*	Parasitism	Romagnesi, 1963
M. semilibera	*Ulmus minor*	Ectomycorrhizas	Matruchot, 1909
M. esculenta	*Picea abies*	Ectomycorrhizas	Buscot & Kottke, 1990
M. elata	*Picea abies*	Ectomycorrhizas	Buscot, 1994

Table 2 - - Association between morels and plant roots in nature which have been analysed precisely.

It appears that a sequence analysis of the ITS region of representative taxa will allow to clear the species concept and possibly the philogeny of the *Morchellaceae*. Furthermore, it will give indications on which of the ecological features really characterise species and respectively on which of them only reflect the high ecological plasticity of morels.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the "Deutsche Forschungsgemeinschaft" (DFG-Project -Mykorrhiza und Pflanzenmorphogenetik—, Mu 831/2-3) and to the French German Cooperation Program PROCOPE for their financial support. Dr. M. M. Kyto-viita kindly revised the language.

REFERENCES

BUNYARD B.A., NICHOLSON M.S. & ROYSE D.J., 1994 — A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia* 86: 762-772.

BUSCOT F., 1989 — Field observations on growth and development of *Morchella rotunda* and *Mitrophora semilibera* in relation to forest soil temperature. *Canadian journal of Botany* 67: 589-593.

BUSCOT F. & KOTTKE I., 1990 — The association of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L) Karst. *New phytologist* 116: 425-430.

BUSCOT F. & BERNILLON J., 1991 — Mycosporins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta*. *Mycological research* 95: 752-754.

BUSCOT F., 1992a — Stratégies écologiques et biologiques des Morilles. *Cryptogamie, Mycologie* 13: 171-179.
BUSCOT F., 1992b — Synthesis of two types of association between *Morchella esculenta* and *Picea abies* under controlled culture conditions. *Journal of Plant Physiology* 141: 12-17.
BUSCOT F., 1993 — Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycological Research.* 97: 136-140.
BUSCOT F., 1994 — Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (Fr.) Boudier with *Picea abies* (L.) Karst. *Mycorrhiza* 4: 223-232.
BUSCOT F., WIPF D., DI BATTISTA C., MUNCH J.C., BOTTON B. & MARTIN F., 1996 — DNA polymorphism in morels I: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycological Research* 100: 63-71.
CARPENTER S.E., TRAPPE J.M. & AMMIRATI J.R., 1987 — Observations of fungal succession in the Mont-St Helens devastation zone 1980-1983. *Canadian Journal of Botany* 65: 716-728.
CHADEFAUD M., 1960 — *Traité de botanique*. Tome I, Masson Eds, Paris, 1118 p.
CLOWEZ P., 1992 — Mycorhize entre *Fraxinus excelsior* et *Morchella vulgaris* "signe bioindicateur de site archéologique". *Bulletin de la Société Linnéenne Nord Picardie* 10: 43-46.
CLOWEZ P. & WIPF D., 1997 — (submitted). Les morilles de stratégie pérenne et colonisatrice: relations avec certaines essences d'arbres et plantes mellifères d'apparition spontanées en France. *Documents Mycologiques*, M. Bon Eds.
CONDAMY & CORNU M., 1878 — Communication puis notes sur quelques champignons printaniers (*Morchella, Gyromitra, Verpa*). *Bulletin de la Société Botanique de France* 25: 128-131.
DUCHESNE L.C. & WEBER M.G., 1993 — High incidence of the Edible Morel *Morchella conica* in a Jack Pine, *Pinus banksiana*, forest following prescribed burning. *Canadian Field — Naturalist*, 107, 1 (Jan-Mar 1993): 114-116.
GESSNER R.V., 1995 — Genetics and systematics of North American populations of *Morchella*. *Canadian Journal of Botany* 73 (Suppl. 1): 967-972
GESSNER R.V., Romano M. A. & Schultz R. W., 1987 — Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. *Mycologia* 79: 683-687.
HERVEY A., BISTIG G. & LEONG I., 1978 — Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia* 70: 1269-1274.
JACQUETANT E., 1984. *Les Morilles*. Plantanida Eds, Lausanne, 112 p.
KAUL T.N., 1975 — Studies on genus *Morchella* in Jamma and Kashmir, 1) Soil composition in relation to carpophore development. *Bulletin de la société Botanique de Bengal* 29: 127-134.
KORF R.P., 1973 — *Discomycetes and Tuberales. In* G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman (ed.), The Fungi Vol.4, Academic Press, New York-London, pp. 249-319.
KULKARNI R. & KAMERATH G.D., 1989 — Isozyme analysis of *Morchella* species. *Mushroom Science* 12: 451-457.
MATRUCHOT L., 1909. *La culture des champignons comestibles* : 418-659.
MAYR R., 1982 — *Untersuchungen zum wachstum und zur Entwicklung einiger Arten der Mykorrhiza bildenden Gattung Morchella.* Dissertation zur Erlagung des Doktorgrades der Naturwissenschften. Universität Giessen: 135p.
MOLLIARD M., 1905 — Production expérimentale de l'appareil ascosporé de la Morille. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Scéances de l'Académie Sciences* 140: 1146-1148.
OWER R., 1982 — Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia* 74: 142-144.
OWER R., MILLS G.L. & MALACHOWSKI J.A., 1986 — Cultivation of *Morchella*. *U.S. Patent*, nb 4,594,809.
PADEN J.W., 1972 — Imperfect states and the taxonomy of the Pezizales. *Persoonia* 6: 405-414.
ROBERT E., 1865 — Relations entre la famille des oleinées et les morilles. *Bulletin de la Société Botanique de France* 12: 244-246.
ROMAGNESI H., 1963 — *Petit atlas des champignons*. Bordas Eds., Paris.

ROYSE D.J. & MAY B., 1990 — Interspecific allozyme variation among *Morchella* spp. and its interferences for systematics within the genus. *Biochemical Systematics and Ecology* 18: 475-479.

ROZE M.E., 1883 — Le parasitisme de *Morchella esculenta* Pers. sur *Helianthus tuberosus* L. *Bulletin de la Société Botanique de France* 30: 139-143.

SNEATH P.H.A. & SOKAL R.R., 1973 — *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Co. San Francisco, California, 573 pp.

TURNAU K., 1984 — Post-fire cup-fungi of Turbacz and Stare Wiechy montains in the Gorge Range (Polish Western Carpathians). *Prace Botaniczne* 12: 145-170.

TURNAU K., 1987 — An emergence of *Morchella semilibera* D.C. Fr. after application of gesaprim 50. *Prace Botaniczne* 15: 153-157.

VOLK T.J. & LEONARD T.J., 1989 — Experimental studies on the morel, 1) heterokaryon formation between monoascosporous strains of *Morchella*. *Mycologia* 81: 523-531.

VOLK T.J. & LEONARD T.J., 1990 — Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94: 399-406.

WEBER N.S., 1995 — *A morel's hunter companion*. Lansing, MI: Two Peninsula Press, 209 p.

WIPF D., BEDELL J.P., MUNCH J.C., BOTTON B. & BUSCOT F., 1996a — Polymorphism in Morels: Isozyme Electrophoretic Analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 819-827.

WIPF D., MUNCH J.C., BOTTON B. & BUSCOT F., 1996b — DNA polymorphism in morels: Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of Genes Coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3541-3543.

YOON C.S., GESSNER R.V. and ROMANO M.A., 1990 — Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex. *Mycologia* 82: 227-235.

COMPOSÉS VOLATILS : UN OUTIL POUR LA CHIMIOTAXONOMIE DES BASIDIOMYCÈTES.

Sophie BREHERET[1], Thierry TALOU[1], Sylvie RAPIOR[2], Jean-Marie BESSIERE[3]

[1] Laboratoire de Chimie agro-industrielle, Institut National Polytechnique de Toulouse, École Nationale Supérieure de Toulouse, 118 Route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex.
[2] Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, 34060 Montpellier cedex 2.
[3] Laboratoire de Chimie Appliquée, École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, [illegible] Rue de l'École Normale, 34296 Montpellier cedex 5.

INTRODUCTION

Les odeurs des Basidiomycètes, largement décrites dans la littérature mycologique, peuvent être un critère important pour l'identification des champignons (Heim, 1957 ; Claus, 1978 ; Locquin, 1984 ; Courtecuisse & Duhem, 1994). Quelques bibliothèques de champignons classés par note odorante, c'est-à-dire par odeur, sont d'ailleurs fournies (Gilbert, 1934 ; Claus, 1978 ; Mornand & Taillandier, 1978 ; Locquin, 1984). D'autre part, les composés volatils des Basidiomycètes, extraits par différentes techniques, ont largement été étudiés (Maga, 1981 ; Mau *et al.*, 1994). Pourtant peu d'auteurs ont établi les corrélations entre l'odeur du champignon analysé et les molécules extraites (Wood *et al.*, 1992 ; Wood *et al.*, 1994). Dans cette étude, les arômes des carpophores de 26 champignons odorants, classés par note odorante selon le référentiel olfactif « Le Champ des Odeurs » (Jaubert, 1987), ont été piégés par concentration des effluves sur TENAX, puis analysés par GC-Sniffing et GC/MS, afin d'identifier les composés clés odorants.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Des carpophores frais de 26 espèces ont été récoltés dans la région Languedoc-Roussillon et identifiés par l'un d'entre nous (SR) sur la base de la classification de Courtecuisse et Duhem (1994) : *Agaricus silvicola* (Vitt.) Peck, *Agrocybe aegerita* (Brig.) Fayod, *Amanita citrina* (Sch. : Fr.) S.F. Gray, *Amanita ovoidea* (Bull. : Fr.) Link, *Boletus aestivalis* (Paulet) Fr., *Cantharellus cibarius* (Fr. : Fr.) Fr., *Clitocybe nebularis* (Batsch : Fr.) Kummer, *Clitocybe odora* (Bull. : Fr.) Kummer, *Cortinarius cinnamomeus* (L. : Fr.) Fr., *Cystoderma amianthinum* (Scop.) Fayod, *Cystoderma carcharias* (Pers. : Fr.) Fayod, *Gomphidius glutinosus* (Sch. : Fr.) Fr., *Hydnum repandum* L. : Fr., *Hygrophoropsis aurantiaca* (Wülf. : Fr.) Maire, *Hygrophorus agathosmus* (Fr.) Fr., *Laccaria amethystina* (Huds.) Cooke, *Lactarius salmonicolor* Heim & Leclair, *Lepista nuda* (Bull. : Fr.) Cooke,

Espèce de champignon	Description de l'odeur du champignon	Composés clés odorants et/ ou marqueurs chimiques	Description des odeurs des composés
G. glutinosus	terpénique	monoterpènes	odeurs diverses, dominante terpénique
A. ovoidea	marine	monoterpènes	dominante zestée
C. nebularis	moisie-terreuse (farineuse)	octanol hexanol	orangée, fruitée fruitée
L. amethystina	moisie-terreuse (farineuse)	octa-1,3-diène	fruitée
T. portentosum	moisie-terreuse (farineuse)	octène	éthérée-fruitée
T. sulfureum	moisie-terreuse (gaz d'éclairage)	linalol undécène	fraîche fraîche
B. aestivalis	moisie-terreuse (fongique)	4-méthylanisole	florale, verte
C. carcharias	moisie-terreuse	géosmine	moisie-terreuse
C. amianthinum	moisie-terreuse	géosmine	moisie-terreuse
M. pura	verte (raphanoïde)	géosmine hexanal	moisie-terreuse verte
M. rosea	verte (raphanoïde)	hexanal hexan-2-one	verte fruitée-éthérée
C. cinnamomeus	verte (raphanoïde)	hexan-2-one	fruitée-éthérée
A. citrina	verte (pomme de terre crue)	octène styrène undécène	éthérée-fruitée éthérée-fruitée fraîche
L. salmonicolor	zestée (mandarine)	octanal octanol oct-2-énal	orangée, miellée orangée, fruitée fraîche
A. aegerita	fruitée (lie de vin)	2-méthylbutanol 3-hydroxybutan-2-one	éthérée beurrée-lactée
S. luteus	fruitée	octanol	orangée, fruitée
H. aurantiaca	fruitée (aromatique)	octène	éthérée-fruitée
P. betulinus	fruitée	octène octanol	éthérée-fruitée orangée, fruitée
T. caligatum	fruitée (aromatique)	styrène monoterpènes	éthérée-fruitée odeurs diverses, agréable
L. nuda	fruitée (vitaminée)	linalol	fraîche
H. repandum	lactonée-fruitée	octa-1,3-diène	fruitée
C. cibarius	lactonée-fruitée	octa-1,3-diène	fruitée
A. silvicola	anisée	benzaldéhyde alcool benzylique	douce-épicée (amande amère) douce-épicée
C. odora	anisée	anisaldéhyde	anisée
H. agathosmus	douce-épicée (amande amère)	benzaldéhyde	douce-épicée (amande amère)
M. alliaceus	alliacée	composés soufrés	soufrée, alliacée

Tableau 1. — Corrélation entre les odeurs de champignons et les composés clés odorants selon le référentiel olfactif « Le Champ des Odeurs ».

Marasmius alliaceus (Jacq. : Fr.) Fr., *Mycena pura* (Pers. : Fr.) Kummer, *Mycena rosea* (Bull.) Gramberg, *Piptoporus betulinus* (Bull. : Fr.) Karst., *Suillus luteus* (L. : Fr.) Roussel, *Tricholoma caligatum* (Viv.) Ricken, *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quélet, *Tricholoma sulfureum* (Bull. : Fr.) Kummer.

La fraction volatile des carpophores frais a été extraite, 24 heures après la récolte, par analyse directe des effluves, et analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la technique du Sniffing et à la spectrométrie de masse. Les conditions expérimentales sont décrites dans Breheret *et al.* (1996, 1997).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les analyses chimiques et sensorielles des arômes de 26 espèces de champignons ont révélées la présence de 14 composés à huit atomes de carbone, dont l'oct-1-én-3-ol et l'octan-3-one, connus comme responsables de l'odeur fongique (Maga, 1981 ; Mau *et al.*, 1994). 15 molécules à noyau benzénique ont également été identifiées, ainsi que 10 molécules soufrées. Ces dernières ont uniquement été décelées dans l'arôme de *M. alliaceus* et sont responsables de l'odeur soufrée (Rapior *et al.*, 1997). Trente huit composés terpéniques dont 24 monoterpènes (Breheret *et al.*, 1997) et 15 sesquiterpènes ont été analysés. Les stuctures chimiques de 2 monoterpènes et de 13 sesquiterpènes restent méconnues. Les analyses ont révélé la présence d'une série de 28 autres composés de diverses familles chimiques et de 38 molécules non identifiées. Parmi tous ces composés, quelques-uns peuvent être considérés comme des composés odorants clés, c'est-à-dire que leurs odeurs expliquent totalement ou en partie celle du carpophore ; il peut s'agir d'un composé unique ou d'un mélange de composés. Quelques composés pourraient également être considérés comme marqueurs chimiques d'une espèce donnée, s'ils sont spécifiques d'un champignon et présents en quantité suffisamment importante. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

RÉFÉRENCES

BREHERET S., TALOU T., RAPIOR S. & BESSIÈRE J.M., 1996 — Analyse comparative de l'arôme du Clitocybe anisé (*Clitocybe odora*) par extraction au solvant et analyse des effluves. *Rivista Italiana EPPOS* 7 (Spec. Num) : 449-457.

BREHERET S. RAPIOR S., TALOU T. & BESSIÈRE J.M., 1997 — Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes). *Journal of agricultural and food chemistry* (sous presse).

CLAUS G., 1978 — Des odeurs en mycologie. *Documents mycologiques* 8(30-31) : 31-63.

COURTECUISSE R. & DUHEM B., 1994 — *Guide des Champignons de France et d'Europe*. Delachaux and Niestlé, Lausanne, Zwitzerland, 476 p.

GILBERT E.J., 1934 — *Méthode de Mycologie Descriptive*. Librairie E. Le François, Paris, France, pp. 323-366.

HEIM R., 1957 — *Les champignons d'Europe*, Tome 1. Boubée & Cie, Paris, France, pp. 115-122.

JAUBERT J.N., GORDON G. & DORÉ J.C., 1987 — Une organisation du champ des odeurs. Deuxième partie : Modèle descriptif de l'organisation de l'espace odorant. *Parfums Cosmétiques Arômes* 78 : 71-82.

LOCQUIN M., 1984 — *Mycologie Générale et Structurale*. Masson, Paris, France, pp. 337-346.

MAGA J.A., 1981 — Mushroom Flavor. *Journal of agricultural and food chemistry* 29 : 1-10.

MAU J., BEELMAN R.B. & ZIEGLER R.G., 1994 — *Spices, Herbs and Edible Fungi*. G. Charalambous, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 657-684.

MORNAND J. & TAILLANDIER P., 1978 — *Guide Pratique des Odeurs de Champignons*, édition du Choletais, Cholet, France, 14 p.

RAPIOR S., BREHERET S., TALOU T. & BESSIÈRE J.M., 1997 — Volatile Flavor constituents of fresh *Marasmius alliaceus* (Garlic *Marasmius*). *Journal of agricultural and food chemistry* (sous presse, 45 (3)).

WOOD W.F., BROWNSON M. & SMUDDE R.A., 1992. 2-aminobenzaldéhyde : the source of the « sweet odor » of the *Hebeloma sacchariolens*. *Mycologia* 84 : 935-936.

WOOD W.F., BRANDES M.L., WATSON R.L., JONES R.L. & LARGENT D.L., 1994 — Trans-2-nonenal, the Cucumber Odor of Mushrooms. *Mycologia* 86 : 561-563.

IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF A LECTIN ISOLATED FROM THE PHYTOPATHOGENIC BASIDIOMYCETE *RIGIDOPORUS LIGNOSUS*.

Thierry RICHARD[1], Jean GUILLOT[2] and Bernard BOTTON[1]*

[1] Université Henri Poincaré.
Nancy I, Faculté des Sciences.
Laboratoire de Biologie Forestière associé INRA,
BP 239, 54506 Vandocuvre-lès-Nancy Cedex, France
[2] Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand I.
Faculté de Pharmacie,
Laboratoire de Botanique, Cryptogamie et Microbiologie,
28, Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France
* To whom correspondence should be addressed

ABSTRACT: An antiserum raised against the lectin purified from mycelial strands of *Rigidoporus lignosus* (isolate FCA3) was used in Ouchterlony double diffusion to detect lectin in other parts of the colony and in the culture medium, as well as in a number of other African and Asian isolates. The lectin was strongly accumulated in mycelial strands and less concentrated in undifferentiated mycelium. A significant amount was excreted in the culture medium. The lectin in the strands of the FCA3 isolate was serologically identical to those synthesized by the vegetative mycelium, excreted in the culture medium and present in the other isolates. Hemagglutination activity determined with the O group erythrocytes was wery low in a few isolates, and consistent with this, no precipition lines were detected by immunodiffusion, especially in the isolates which hardly ever differentiated mycelial strands. Cross reactions indicated that the lectin of *Rigidoporus lignosus* was related to that of *Boletus edulis* and *Ulex europaeus* I and II, but however not identical with the two latter. No serological relationship was found with 13 other lectins purified from fungi and higher plants, thus confirming the unicity of the lectins in *Rigidoporus lignosus*.

KEY-WORDS: Basidiomycete, Fungi, Lectin, Ouchterlony double diffusion, *Rigidoporus lignosus*

INTRODUCTION

Lectins are diverse multivalent carbohydrate-binding proteins or glycoproteins of non-immune origin that have the property of agglutinating animal and plant cells (Goldstein & Poretz, 1986; Lis & Sharon, 1986). They are widely distributed in animals, plants and fungi and the most extensively studied group of lectins to date is that of the plant family Leguminoseae (Etzler, 1985; Maliarik *et al.*, 1991).

Although many lectins have been isolated and characterized from fungi, the physiological roles of most fungal lectins is still unclear and speculative. In *Conidiobolus lamprauges* and *Neurospora sitophila* the lectin is thought to play an important role in cell wall biosynthesis and mycelial differentiation (Ishikawa *et al.*, 1983; Ishikawa & Oishi, 1989). It has also been postulated that fungal lectins are involved in adhesion and recognition phenomena. Flocculation in *Kluyveromyces bulgaricus* and mating interaction in *Saccharomyces cerevisiae* are mediated by lectins (Al-Mahmood *et al.*, 1988; Terrance *et al.*, 1987), while in lichens, fungal lectins are involved in the relationship between fungi and algae (Lockhart *et al.*, 1978). The lectins of ectomycorrhizal fungi such as *Lactarius deliciosus, L. deterrimus* and *L. salmonicolor* appear to be involved in the early stages of recognition with *Pinus sylvestris, P. abies* and *Abies pectinata*, respectively (Giollant, 1991; Giollant *et al.*, 1993). Adhesion by lectins may also be the initial step in certain infection processes. Thus, the zoospores of *Phytophthora cinnamomi* adhere to root cells of corn by means of lectins (Hinch & Clarke, 1980). In addition, the lectins on the trap surface of many nematode-trapping fungi are important in the attachment of those fungi to nematodes (Tunlid *et al.*, 1992).

Rigidoporus lignosus is a tropical basidiomycete causing great losses in plantations of a number of species, especially *Hevea brasiliensis* (Rubber tree) and *Tectona grandis* (Teak). The fungus differentiates flattened mycelial strands which infest the roots of healthy rubber trees (Nandris *et al.*, 1987). With the aim to control dissemination of the fungus, research has been conducted to gain better knowledge of the mycelial strand differentiation processes. Results have demonstrated the presence in *Rigidoporus lignosus* of a lectin which was composed of four identical submits of 35 kDa, had ▪ high affinity for L-fucose and was synthesized concomitantly with strand formation (Richard, 1995). The lectin was cytosolic in the vegetative cells but was located at the periphery of the strand cells where the affinity sites for the lectin were also distributed (Richard *et al.*, 1994). In addition the affinity sites for the lectin were also present on the root surfaces of *Hevea brasiliensis* (Richard, 1995), suggesting that this lectin may be involved, both in the processes of mycelial strand formation and in host recognition. However a detailed analysis of the accumulation and distribution of this lectin has not been carried out yet.

In the present paper, the lectin extracted from *Rigidoporus lignosus* strands was immunologically compared to the lectins present in the other parts of the colony and in several other strains of this pathogenic fungus. Moreover, the antibodies were used to assess the immunological relationship between the *Rigidoporus lignosus* lectin and a few others isolated from fungi and higher plants.

MATERIALS AND METHODS

Fungi and culture conditions

Ten *Rigidoporus lignosus* strains (also called isolates), isolated from *Hevea brasiliensis* roots were obtained from the Rubber Research Institute in Paris. The details of geographical origin and year of isolation are listed in Table 1. Five strains were isolated from Africa and five from Asia. Purification and characterization of a lectin were carried out from the FCA3 strain coming from Cameroun.

All the strains were conserved as mycelial stock cultures in the dark on 2% malt agar medium at 24°C. For the extraction of the lectins, the fungi were grown in static cultures at 28°C, in 240 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml 2% malt liquid medium.

The surface of the medium was inoculated with a 7 mm-diameter disc of solid medium punched out from the edge of a 7 day-old colony grown on malt agar.

Isolates	Origin	Isolation (year)
FCI9	Ivory Coast (South-West)	1989
FCA3	Cameroun (South-West)	1989
FGA1	Gabon (North-Mitzic)	1989
FGA4	Gabon (North-Mitzic)	1991
FGA7	Gabon (South-Kango)	1991
FID1	Indonesia (North-Sumatra)	1988
FID2	Indonesia (North-Sumatra)	1989
FID3	Indonesia (West-Kalimatan)	1989
FML3	Malaysia (South)	1989
FML4	Malaysia (South)	1989

Table 1. Isolate designation, geographic origin and year of isolation of the studied *Rigidoporus lignosus* isolates

Estimation of lectin activity

To determine lectin content in colonies, all the strains were grown for 3 weeks in liquid medium. Vegetative mycelia and mycelial strands were weighed and extracted separately in PBS (phosphate-buffered saline; 1.5 mM-KH2PO4/10 mM-Na2HPO4, pH 7.4; 3 mM-KCl; 140 mM-NaCl). The resulting homogenate was centrifuged at 40,000 g for 20 minutes to remove insoluble residues. Thereafter, lectin and protein concentrations of the supernatant were determined.

Lectin activity was estimated in microtiter plates by a serial dilution method as already described by Al-Mahmood *et al.* (1988). To 100 µl aliquots obtained by dilution of the lectin solution, an equal volume of a 2% suspension of washed human red blood cells (O group) in PBS was added. Plates were left overnight at 4°C and examined for agglutination. The titre was defined as the reciprocal of the highest lectin dilution that still agglutinated the cells. Specific activity was the titre expressed by 1 mg protein.

Protein concentration was measured according to the method of Bradford (1976) using Bovin Serum Albumin as a standard.

Production of antibodies and Double immunodiffusion assay

Polyclonal antibodies were obtained with the lectin extracted from the mycelial strands of the FCA3 strain according to a method described previoulsy (Botton *et al.*, 1987).

Specificity of the antibodies was tested by Western blot techniques as already described (Richard, 1995). Since the antiserum against the lectin from the FCA3 strain reacted exclusively with the lectin polypeptides on a Western blot of total extracts from other strains and did not react with any polypeptide band when the same extracts were depleted of lectin (result not shown) we assume that the antibodies were monospecific.

Double immunodiffusion was carried out according to Ouchterlony (1959), on the surface of microscope slides (76 x 26 mm) which were covered with 3 ml of 1.2% agarose (Indubiose A37, Reactifs IBF) dissolved in PBS. Lectins and antibodies diffused towards one another at room temperature under saturated atmosphere. Precipitation lines were observed by examining the slides on a black background without any staining. Alternatively, slides weres rinsed overnight with 0.85% NaCl so as to eliminate unprecipitated proteins, then after dehydration, precipitation lines were stained with Coomassie brilliant blue R.

Comparison of the *Rigidoporus lignosus* lectin with lectins from other fungi and higher plants

In order to gain better knowledge of the structure of the lectin isolated from *Rigidoporus lignosus*, cross reactions were performed with antibodies and different lectins isolated and purified from fungi such as *Boletus edulis* (specificity: lactose), *Russula nigricans* (specificity: N-acetyl-β-D-galactosamine) and *Candida albicans* (specificity: L-fucose/N-acetyl-β-D-glucosamine), as well as from higher plants such as *Sophora japonica* (specificity: N-acetyl-β-D-galactosamine), *Canavalia ensiformis* (specificity: α-D-mannose), *Ricinus communis* (specificity: β-D-galactose), *Lens culinaris* (specificity: α-D-mannose/α-D-glucose), *Phaseolus vulgaris* (specificity: N-acetyl-β-D-galactosamine/lactose), *Genista scoparia* (specificity: N-acetyl-β-D-galactosamine/β-D-galactose), *Glycine max* (specificity: N-acetyl-β-D-galactosamine, *Ulex europaeus* I (specificity: α-L-fucose), *Ulex europaeus* II (specificity: N-acetyl-β-D-glucosamine), *Pisum sativum* (specificity: D-mannose), *Laburnum alpinum* (specificity: salicine) and *Cytisus sessilifolius* (specificity: salicine/di-N-acetylchitobiose).

Most of the lectins were provided by Prof. J. Guillot's laboratory of Botany, Cryptogamy and Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Clermont-Ferrand (France). They were purified using protocols previously described (Guillot *et al.*, 1983; Guillot *et al.*, 1991).

RESULTS

Comparison of the lectins from different parts of the colony and excreted in the culture medium

The *Rigidoporus lignosus* lectins of the FCA3 strain were compared by Ouchterlony double diffusion using antiserum raised against the mycelial strand lectin. As shown in Fig. 1, antibodies gave rise to a precipitation line with the strand crude extracts and with those obtained at different purification steps. Similar immunoprecipitations were obtained with crude extracts from vegetative mycelium and with culture filtrates. This suggests that the lectin was produced, not only by mycelial strands, but also by undifferentiated cells and, moreover, partially excreted into the culture medium. The Ouchterlony test gave rise to one continuous precipitation band, indicating that all the lectins were serologically identical to that of the strands.

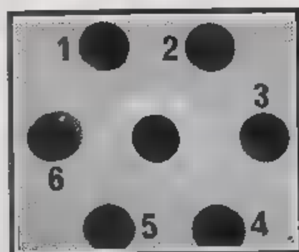


Fig. 1 — Ouchterlony double diffusion patterns of lectins produced by the FCA3 strain of *Rigidoporus lignosus*. Antiserum raised against the mycelial strand lectin was deposited in the central well and challenged with antigens in the outer wells. 1: crude extract of mycelial strands, 2: mycelial strand extract purified by ammonium sulfate (30-80 % saturation), 3: mycelial strand extract purified by subsequent anion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel, 4: mycelial strand extract purified by subsequent affinity chromatography on L-fucose-agarose column, 5: crude extract of vegetative mycelium, 6: twice concentrated culture filtrate of *Rigidoporus lignosus*, strains FCA3 (3 week-old-cultures).
Each well contained about 5 µg of purified lectin or antibodies and 25 µg of protein when crude extracts were used. Precipitation lines were observed on a black background without any staining.

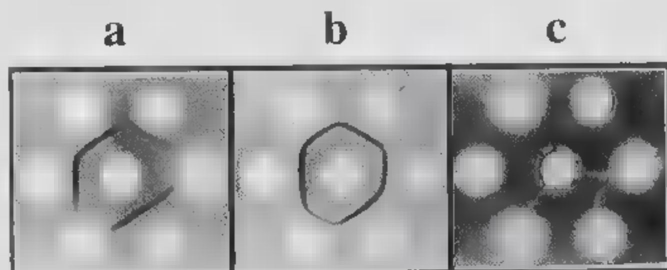


Fig. 2 — Ouchterlony double diffusion patterns of lectins produced by different isolates of *Rigidoporus lignosus*. Antiserum raised against the FCA3 lectin was deposited in the central well and reacted with mycelial crude extracts placed in the outer wells (outer well numbers correspond to those in Fig. 1). a) 1: purified lectin from vegetative mycelium (isolate FCA3), 2: FID1 isolate, 3: FID2 isolate, 4: purified lectin from mycelial strands (isolate FCA3), 5: FGA1 isolate, 6: FML3 isolate, b) 1: purified lectin from mycelium (isolate FCA3), 2: FML4 isolate, 3: FCI9 isolate, 4: purified lectin from mycelial strands (isolate FCA3), 5: RP1 isolate, 6: FGA7 isolate, c) 1: purified lectin from the culture medium (isolate FCA3), 2: FCA3 isolate, 3: Bovine Serum Albumin (control), 4: purified lectin from the culture medium (isolate FCA3), 5: F1D3 isolate, 6: FGA4 isolate.
Each well correspond to a crude extract containing 25 µg proteins. Precipitation lines were visualized by Coomassie blue staining.

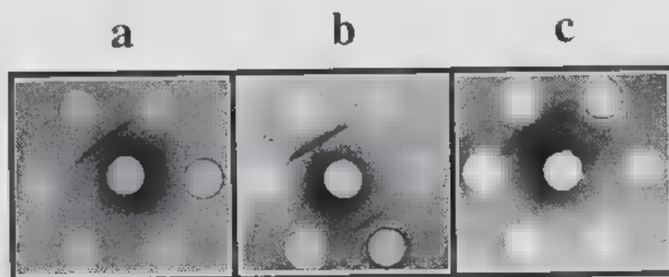


Fig. 4 — Ouchterlony double diffusion patterns of different lectins produced by fungi and higher plants. Antiserum raised against the FCA3 lectin of *Rigidoporus lignosus* was deposited in the central well and reacted with purified lectins of different organisms placed in the outer wells (outer well numbers correspond to those in Fig. 1). a) 1: purified lectin from vegetative mycelium (isolate FCA3: control), 2: *Sophora japonica* lectin, 3: *Canavalia ensiformis* lectin, 4: *Ricinus communis* lectin, 5: *Lens culinaris* lectin, 6: *Phaseolus vulgaris* lectin, b) 1: purified lectin from vegetative mycelium (isolate FCA3: control), 2: *Genista scoparia* lectin, 3: *Russula nigricans* lectin, 4; *Boletus edulis* lectin, 5: *Glycine max* lectin, 6: *Candida albicans* lectin, c) 1: purified lectin from vegetative mycelium (isolate FCA3: control), 2: *Ulex europaeus* II lectin, 3: *Ulex europaeus* I lectin, 4: *Pisum sativum* lectin, 5: *Laburnum alpinum* lectin, 6: *Cytisus sessilifolius* lectin.
Each well contained about 5 µg of lectin. Precipitation lines were visualized by Coomassie blue staining.

Cross reactions with other *Rigidoporus lignous* strains

Several lectin crude extracts obtained from different isolates of *Rigidoporus lignosus* were challenged with the antiserum in double immunodiffusion assays (Fig. 2). When precipitation lines were obtained they were continuous with each other. Therefore the lectins synthetized by the strains FID1, FML3 (Fig. 2a), FML4, FCI9, RP1, FGA7 (Fig. 2b), FID3 and FGA4 (Fig. 2c) are qualitatively similar to that of the FCA3 isolate, in terms of their immunological properties. However, reactivity of the lectins towards the antibodies was quantitatively different. Indeed, as lectin extraction was carried out from a similar mass of mycelium in each isolate, it can be seen that lectins were much less abundant in FID1 (Fig 2a), RP1 (Fig. 2b), FGA4 (Fig. 2c) and especially in the FID3 isolate (Fig. 2c). No precipitation lines were observed with the isolates FID2 and FGA1 (Fig. 2a).

Estimation of a lectinic activity in different *Rigidoporus lignosus* isolates

Specific activity of the lectins was measured by the hemagglutination test in the isolates mentioned above, except in the RP1 isolate which was not included. As shown in figure 3, the highest productions of lectin were found in decreasing order in the isolates FCA3, FGA4, FCI9, FML4 and FML3. Hemagglutination activity was considerably reduced with the other isolates, especially in the FID1, FID2 and FGA1 isolates, which is in agreement with the Ouchterlony tests, as no precipition bands were detected in the two latter isolates.

The highest lectinic activities were found in mycelial strands and the lowest were usually confined to the vegetative mycelium, an intermediate significant amount of the lectin being excreted into the culture media. However, isolates FID1 and FID2 did not reveal excreted lectins (Fig. 3). Two isolates, FCI9 and FID3 did not differentiate mycelial strands. In the former isolate, lectin was highly concentrated in the mycelium and in the latter isolate, lectin synthesis was strongly reduced (Fig. 2), which is consistent with the faint precipitation band found in the Ouchterlony test (Fig. 2c).

Cross reactions with purified lectins of other organisms

Fifteen purified lectins from higher plants and fungi were challenged with the antibodies in immunodiffusion tests. The FCA3 lectin, isolated from vegetative mycelium was used as a control. Figure 4 shows the results of these studies and reveals that only the lectins of the Basidiomycete *Boletus edulis* (Fig. 4b) and to a lesser extent, the lectins I and II of *Ulex europaeus* (Fig. 4c) gave rise to a weak but discernible reaction upon double immunodiffusion. The position of the *Boletus edulis* lectin on the microscope slide did not allow determining any serological relationship with the FCA3 lectin. On the other hand, the result shown in Fig. 4c reveals that the FCA3 lectin is related, but not identical, to the two *Ulex europaeus* lectins, as evidenced by a substantial spur formation between wells 1 and 2. No precipitation bands were detected with the other lectins.

These results indicate that the FCA3 lectin of *Rigidoporus lignosus* shares some antigenic determinants with the lectins of *Boletus edulis* and *Ulex europaeus*, but reaction with this latter clearly indicates that each lectin is slightly different. The results obtained with the other lectins indicate that their antigenic determinants are different from those of the FCA3 lectin, probably reflecting differences in their primary or/and tertiary structures.

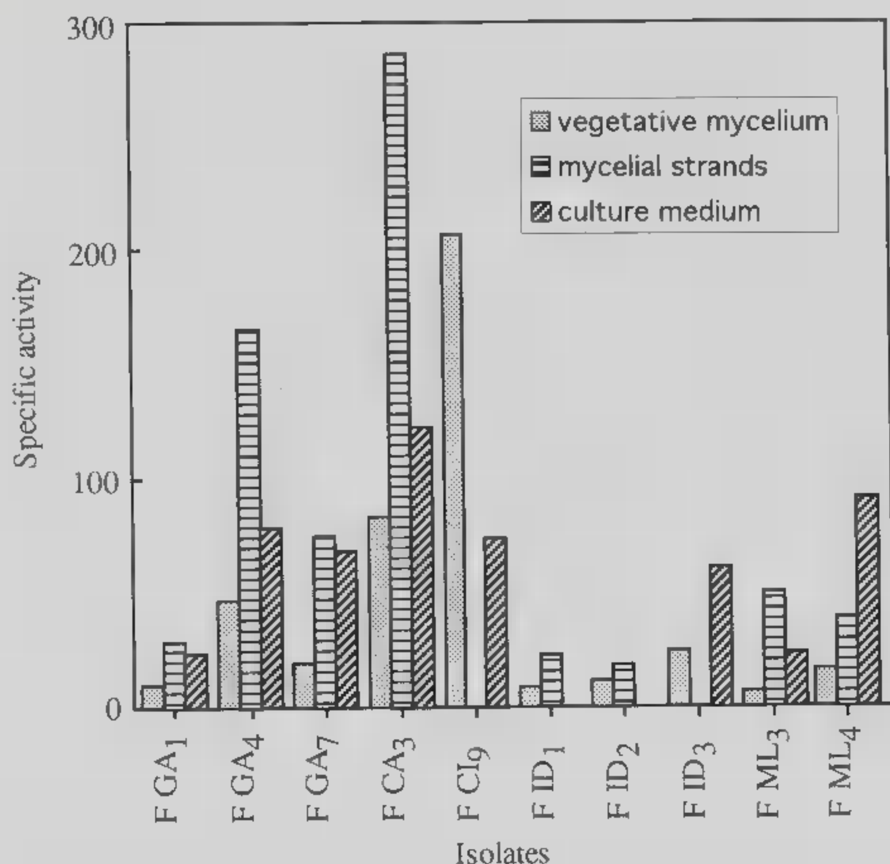


Fig. 3 — Lectinic activity in 10 isolates of *Rigidoporus lignosus*. Hemagglutination tests were carried out separately on vegetative mycelium, mycelial strands and with the culture medium. Age of the cultures: 3 weeks.

CONCLUSION

A lectin was found to be present in *Rigidoporus lignosus* and purified from mycelial strands. The antibodies raised against this lectin allowed an analysis of its accumulation and distribution in fungi and plants. A comparative study carried out by double immunodiffusion assays on ten strains isolated from Asia and Africa revealed that all of them contained a serologically identical lectin. The lectin was found at low concentrations in the vegetative mycelium, while it accumulated much more in mycelial strands. Many lectins have been isolated from fruit bodies of higher fungi and characterized, and there are only a few reports describing lectins in mycelia (Guillot *et al.*, 1991; Kawagishi *et al.*, 1997). The lectin of *Rigidoporus lignosus* is also excreted in the culture medium which

has, so far, rarely been reported, except for a few yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* (Basu *et al.*, 1986), *Candida albicans* (Critchley & Douglas, 1987) and *Kluyveromyces bulgaricus* (Al-Mahmood *et al.*, 1988).

Some isolates investigated in this study did not differentiate mycelial strands and usually produced a low level of lectin. This is consistent with a significant accumulation of lectin found in the strands and with a close correlation between production of lectin and differentiation of these aggregated structures. It has been proposed that the lectin of *Rigidoporus lignosus* be involved in cell aggregation (Richard, 1995).

All the lectins found in the different isolates of *Rigidoporus lignosus* were closely related to each other, obviously sharing the same antigenic determinants and no serological differences were detected. Some slight differences probably exist between the different lectins but they were not detected by the immunological procedures used in this study. Richard (1995) showed that the FCA3 isolate actually produced three different lectins which are glycoproteins slightly different as to their carbohydrate contents. They were respectively accumulated in vegetative mycelium, strands and excreted into the culture medium. Such differences detected within a species, very likely should exist between isolates.

The lectin of *Rigidoporus lignosus* is immunologically different from most of the other lectins already purified from fungi and higher plants. This is in agreement with the amino acid sequence data of the lectin which showed no homology with known lectins (Richard, 1995). Future approaches should be directed to the molecular analysis of the role of this lectin in the fungus, especially in the processes leading to strand formation.

REFERENCES

AL-MAHMOOD S., GIUMELLY P., BONALY R., DELMOTTE F. & MONSIGNY M., 1988 — *Kluyveromyces bulgaricus* yeast lectins. Isolation of *N*-acetylglucosamine and galactose-specific lectins: their relation with flocculation. *The journal of biological chemistry* 263: 3930-3934.

BASU J., KUNDU M., MUKHERJEE K. & CHAKRABARTI P., 1986 — Release of a lectin from a fatty acid auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae* grown in presence of oleic acid. *Biochemical and biophysical research communications* 136: 596-602.

BOTTON B., MSATEF Y. & GODBILLON G., 1987 — Regulation of NADP-dependent glutamate dehydrogenase during morphogenesis of the Ascomycete *Sphaerostilbe repens*. *Journal of plant physiology* 128: 109-119.

BRADFORD M.M., 1976 — A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.

CRITCHLEY I.A. & DOUGLAS L.J., 1987 — Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *Journal of general microbiology* 133: 637-643.

ETZLER M.E., 1985 — Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annual review of plant physiology* 36: 209-234.

GIOLLANT M., 1991 — *Les lectines des Lactaires du groupe Dapetes: (L. deliciosus, L. deterrimus, L. salmonicolor) purification, étude biochimique et spécificité. Intervention des lectines dans les phénomènes de reconnaissance moléculaire au cours des événements précoces de la mycorhization avec les conifères associés.* Dissertation thesis, University of Auvergne, Clermont-Ferrand, France. 181 p.

GIOLLANT M., GUILLOT J., DAMEZ M., DUSSER M., DIDIER P. & DIDIER E., 1993 — Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant physiology* 101: 513-522.

GOLDSTEIN I.J. & PORETZ R.D., 1986 — Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. *In*: Liener I.E., Sharon N & Goldstein I.J. (eds), *The lectins. Properties, functions and applications in Biology and medecine*. Academic Press, Orlando, FL, U.S.A., pp. 33-247.

GUILLOT J., GENAUD L., GEUGNOT J. & DAMEZ M., 1983 — Purification and properties of two hemagglutinins of the mushroom *Laccaria amethystina*. *Biochemistry* 22: 5365-5369.

GUILLOT J., GIOLLANT M., DAMEZ M., DUSSER M., DIDIER P. & DIDIER E., 1991 — Isolation and characterization of a lectin from *Lactarius deliciosus*. *Journal of biochemistry* 109: 840-845.

HINCH J.M. & CLARKE A.E., 1980 — Adhesion of fungal zoospores to root surfaces is mediated by carbohydrate determinants of the root slime. *Physiological plant pathology* 16: 303-307.

ISHIKAWA F. & OISHI K., 1989 — Production, purification and characterization of *Neurospora sitophila* lectin. *Agricultural and biological chemistry* 53: 1769-1776.

ISHIKAWA F. OISHI K. & AIDA K., 1983 — Chitin-binding haemagglutinin associated with the cell wall of *Conidiobolus lamprauges*. *Agricultural and biological chemistry* 47: 587-592.

KAWAGISHI H., MITSUNAGA S.I., YAMAWAKI M., IDO M., SHIMADA A., KINOSHITA T., MURATA T., USUI T., KIMURA A. & CHIBA S., 1997 — A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 44: 7-10.

LIS H. & SHARON N., 1986 — Applications of lectins. *In*: Liener I.E., Sharon N & Goldstein I.J. (eds), *The lectins. Properties, functions and applications in Biology and medecine*. Academic Press, Orlando, FL, U.S.A., pp. 293-370.

LOCKHART C.M., ROWELL P. & STEWART W.D.P., 1978 — Phytohemagglutinin from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *Peltigera polydactyla*. *FEMS microbiology letters* 3: 127-130.

MALIARIK M.J., ROBERTS D.D. & GOLDSTEIN I.J., 1991 — Antigenic and calcium binding properties of a peptide containing the essential cysteine in lima bean lectin. *Plant physiology* 95: 286-290.

NANDRIS D., NICOLE M. & GEIGER J.P., 1987 — Root rot diseases. *Plant diseases*. 71: 298-306

OUCHTERLONY O., 1959 — Diffusion-in-agar methods for immunologic analysis. *Progress in allergy* 5: 1-78.

RICHARD T., 1995 – *Contribution à l'étude de la lectine du champignon basidiomycete Rigidoporus lignosus. Purification, propriétés physico-chimiques et localisation de la lectine et de ses sites d'afinité*. Dissertation thesis. University of Nancy I, France. 202 p.

TERRANCE K., HELLER P., WU Y.-S. & LIPKE P.N., 1987 — Identification of glycoprotein components of a-agglutinin, a cell adhesion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 169: 475-482.

TUNLID A., JANSSON H.-B. & NORDBRING-HERTZ B., 1992 — Fungal attachment to nematodes. *Mycological research* 96: 401-412.

Source : MNHN, Paris

PROPAGULES FONGIQUES DE L'AIR ET DISPERSION DE LA POLLUTION INDUSTRIELLE

REISINGER Otto (1) et BALÀZSY Sàndor (2)
Réseau Européen d'Écologie Microbienne.

(1) Université de Nancy I, Faculté des Sciences, Unité d'Écologie Microbienne.
B.P. 239, 54 506 VANDOEUVRE LES NANCY, FRANCE
Fax : 33 (03) 83 27 09 59
E-Mail : reisinge@scbiol.u-nancy ; fr
(2) Bessenyei György Tanàrképzö Föiskola, Növénytani Tanszék. Sostoi út 31/B.
4400 NYIREGYHÀZA, HONGRIE
Fax : 36 (06) 42 312 116
E-Mail : balazsy@ny1.bgytf.hu

RÉSUMÉ : Les propagules végétales et microbiennes formées sur des sites pollués (métaux lourds, xénobiotiques, etc..) transportent également lors de leur dissémination des polluants dont elles sont sans doute chargées. Les résultats partiels rapportés ici, obtenus dans le cadre d'un vaste programme (*), apportent les premiers éléments de caractérisation de ce nouveau flux qui n'a pas encore fait l'objet d'étude cohérente. Ils concernent la composition qualitative et quantitative de la microflore fongique des zones contaminées ou non, le transfert des métaux du sol vers les propagules via la plante et l'efficacité de libération, par des microorganismes, du Ni des tissus végétaux. Les études ultrastructurales montrent que les PCB (polychlorobiphényles), produits très toxiques, ou des fractions importantes de cette substance se localisent dans la paroi et le cytoplasme microbiens. Ils peuvent donc être exportés hors du site et rien ne s'oppose à l'hypothèse de leur concentration dans des lieux plus ou moins éloignés et au sein d'organismes divers.

(*) Titre : Rôle de la microfaune, de la flore et de la microflore dans la gestion de la pollution industrielle.

MOTS CLÉS : Site pollué, microflore de l'air, métaux lourds, transport des polluants, bilan de transfert, efficacité de libération, PCB - localisation ultrastructurale.

SUMMARY : Plant and microbial propagules formed on polluted sites (heavy metals, xenobiotics..) also transport, during their dissemination, pollutants of which they are probably loaded. Partial results reported here, obtained within a large program (*) give the first elements of characterization of this new flux not yet been coherently studied. They concern : - qualitative and quantitative composition of fungal microflora of zones, contaminated or not contaminated, - transfer of metals from soil to propagules by the way of plants, - efficiency of liberation, by microorganisms, of Ni from plant tissues. Ultrastructural studies reveal that PCBs (polychlorobiphenyles), which are very toxic, or important fractions of these substances, become fixed in the microbial wall or in the cytoplasm. So they may be exported from the site and nothing can be opposed to the hypothesis of their concentration in more or less distant places, inside various organisms.

(*) Title : Role of microfauna, of flora and of microflora in management of industrial pollution.

KEY WORDS : Polluted site, air microflora, heavy metals, pollutant transport, transfer balance, liberation effeciency, ultrastructural localization of PCB.

INTRODUCTION

L'aptitude des plantes à concentrer certains métaux est connue depuis longtemps. Il en est de même pour des microorganismes dont la capacité de bioimmobilisation et/ou de bioaccumulation est exploitée, lors de la confection des biofiltres utilisés pour la purification des effluents et la réhabilitation des sites. La bibliographie, surabondante sur ce sujet, et les pratiques maintenant courantes oublient cependant qu'il existe une fraction de la flore et de la microflore, qui chargée de polluants par les mécanismes précités quitte le biotope grâce aux facteurs : Homme, faune, eau et air.

La réglementation permet de maîtriser l'effet de l'Homme et, en partie, celui des animaux. Un contrôle régulier des eaux de surface et des nappes phréatiques autorise en cas de besoin une intervention rapide et efficace

Il n'en est pas de même pour la microfaune et pour l'air. Les propagules, *sensu lato* , exportées par voie aérienne ou par des animaux incontrôlables (Acariens, Collemboles, Abeilles, etc..) sont selon toute logique chargées sinon surchargées en polluants. De plus, on sait par ailleurs et depuis longtemps (Al Mahmood *et al.*., 1987 ; Bartnicki-Garcia, 1968 ; Bartnicki-Garcia & Lippman, 1982 ; Bonaly & Reisinger, 1971 ; Mbbawala *et al.*, 1990 ; Zaamoun *et al.*, 1995) que les conditions de culture, surtout la nature de la source trophique, changent les taux relatifs des composants de la paroi microbienne en modifiant la quantité et la qualité des protéines. Ainsi des nouvelles protéines, en situation périphérique, seront même en contact direct avec le milieu extérieur. Cette situation est peut-être comparable à celle analysée par Moneret-Vautrin (1997) pour les modifications des allérgènes alimentaires.

Il est alors surprenant de noter qu'il n'existe aucune étude ou proposition cohérente pour l'évaluation quantitative et qualitative des polluants exportés et de l'impact que représente ce flux de propagules modifiées pour l'environnement et surtout pour l'environnement humain. Le but essentiel de ce travail est donc de présenter une première tentative d'évaluation des charges transportées par les propagules de l'air dans quelques situations choisies. Les résultats partiels, rapportés ici, ont été obtenus dans le cadre d'un vaste projet européen ayant pour but d'étudier le rôle de la flore, de la microfaune et de la microflore dans la gestion de la pollution industrielle. Ils concernent essentiellement les propagules fongiques libres (spores, fragments d'organes végétatifs, etc.). Le cas des propagules associées à des particules de nature diverse (grains de pollen, fragments végétaux, feuillets d'argiles, etc.) fera l'objet de travaux ultérieurs. Il ne sera qu'évoqué dans le cadre de cette étude.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel fongique

Dans le cas des parasites obligatoires, le matériel fongique, les échantillons de terre, les jeunes plantules et les plantes en fin de végétation ont été directement prélevés dans un champ (en Meurthe et Moselle, France), proche de Badonviller.

Dans le cas des saprophytes, les souches, isolées de l'air en Lorraine, sont cultivées sur extrait de malt gélosé ou liquide additionné ou non de doses croissantes de métal.

Microflore de l'air

La microflore de l'air est étudiée par sédimentation à l'aide de la technique « boîtes de Pétri ouvertes » (fig. 2) ou en utilisant un aérocollecteur (Airtest). Cet appareil projette les propagules sur la surface d'un milieu gélosé contenu dans des boîtes de 6 cm de diamètre. Les deux méthodes ne permettent d'étudier que la fraction cultivable. Le dénombrement des propagules est donc basé sur le comptage des UFC (Unité Formant une Colonie).

Les colonies obtenues sont ensuite classées en 4 catégories et les microorganismes sont caractérisés et identifiés, jusqu'au genre dans le cas des champignons.

Études ultrastructurales

La localisation des PCB dans les cellules microbiennes est effectuée suivant la méthodologie décrite par Bully et Reisinger (1994). Le matériel microbien provient d'un sol contaminé « par erreur » ou il est obtenu en présence de doses connues de PCB. Il est traité suivant la méthodologie classique après double fixation (glutaraldéhyde et OsO4). Les coupes fines obtenues à l'aide d'un couteau de diamant sont observées directement ou sont d'abord contrastées au citrate de plomb (Reynolds, 1963) ou suivant la technique de mise en évidence des polyosides (Thiery, 1967).

Dosages chimiques

À l'exception des PCB, les dosages chimiques sont effectués par deux laboratoires extérieurs.

Efficacité de la libération et bilan de transfert

Dans le cas des saprophytes :

— la technique consiste à soumettre dans une toile à bluter des tissus végétaux contaminés à l'action d'un ou plusieurs microorganismes ensemencés dans le milieu liquide. Les métaux libérés sont dosés après incubation, suivie de centrifugation, dans le surnageant et dans les cellules microbiennes (culot).

Dans le cas des parasites obligatoires

— le bilan de transfert est évalué par la comparaison des taux des métaux dans le sens « sol-plantes-propagules du parasite ».

Seuil de tolérance

La recherche des souches résistantes et la détermination des seuils de tolérance sont réalisées à l'aide des techniques habituelles. (Techniques des puits, des stries, des doses croissantes de métaux dans les milieux, pesées du matériel fongique obtenu en milieu liquide, etc..).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Distribution quantitative des UFC (site pollué et non pollué).

Nous avons réuni dans la figure 1 les données moyennes de deux années (septembre 1995 et 1996) recueillies sur deux sites, situés en Europe Centrale. Le site pollué (P) représente en réalité un dépot « oublié » du pays, additionné de déchets étrangers. La zone témoin (N) comparable est une ancienne carrière distante de 21 km. Les deux structures résultent d'une excavation étagée de 2-7 m de profondeur. Les prélèvements sont effectués de 50 en 50 cm du bas vers le haut. (1P à 5P pour la zone polluée et 1N à 5N pour la zone non polluée). Les valeurs représentent la moyenne de 5 répétitions effectuées à des points éloignés de 2 m en 2 m et situés sur une même ligne. L'analyse des valeurs montre l'existence de deux concentrations élevées en propagules fongiques situées respectivement au niveau 1 (1N et 1P = 50 cm du sol) et au niveau 5 (5N et 5P = 2,50 cm du sol). Le niveau 1 correspond au creux des sites et le 5 à l'étage supérieur où dans la décharge, les résidus ont été couverts de terre, et. où apparaît déjà une végétation naturelle. Cette dernière, composée essentiellement d'une Graminée, concentre un taux très élevé de métaux, notamment du Cr, Zn, Ni, As, Co, etc. Elle est également associée à une flore fongique particulière dont l'analyse est en cours.

On notera également que dans les cas extrêmes (niveau 1 et 5), la charge fongique est plus élevée dans l'air de la zone polluée (P) que celle notée dans l'espace naturel (N).

La différence signalée pour le niveau 1 est sans doute due à « l'effet creux » créé par les vents dominants descendants. Celle des zones polluées est l'image d'une plus grande quantité de propagules fongiques formées à cause de la pollution. Cette flore reste cependant qualitativement plus pauvre que celle de la zone exempte de polluants (fig. 2). Elle contient donc des espèces et des souches résistantes sélectionnées naturellement. Nous possédons actuellement 67 isolats dont certains, en plus de leur seuil de tolérance élevé, concentrent des doses inhabituelles de métaux. Tel est le cas d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud apte à emmagasiner dans des conditions expérimentales 12 fois plus de Ni que les souches sauvages de référence. Le seuil de tolérance d'une subculture de *Cladosporium sp.* probablement *herbarum*, obtenue par sélection, est de 40 mg/l de NiCl2 alors que celui des isolats habituels n'est que 5 mg/l en milieu liquide. Ces microorganismes représentent un matériel de choix pour la confection des filtres industriels performants.

Transfert des métaux. Sol non pollué-plante-parasite obligatoire

Pour illustrer ce type de transfert de polluants du sol vers l'ensemble de l'écosystème via les propagules fongiques et l'air, nous avons retenu le couple Maïs — *Uromyces maydis* (DC) Corda Le site a été choisi au hasard sur le seul critère d'abondance des plantes atteintes durant les années 1993 et 1994. La culture n'a donc subi aucun traitement particulier.

Les résultats des dosages effectués sont réunis dans la figure 3.

Le taux de métaux du sol est inférieur aux normes (No) hollandaises. La seule augmentation notable de la concentration intéresse seulement les jeunes plantules. Même les données cumulées pour l'ensemble du végétal restent inférieures à celles du sol en mg/kg. À première vue la quantité de métaux pouvant être exportés par les chlamydospores semble insignifiante. Soulignons cependant que l'invasion fongique des tissus par ce parasite est restreinte à une fraction d'organe. Un épi de maïs d'environ 200 gr contient 3 mg de Cu et 0,025 mg de Ni., l'ensemble de chlamydospores récoltées à la place de cet épi

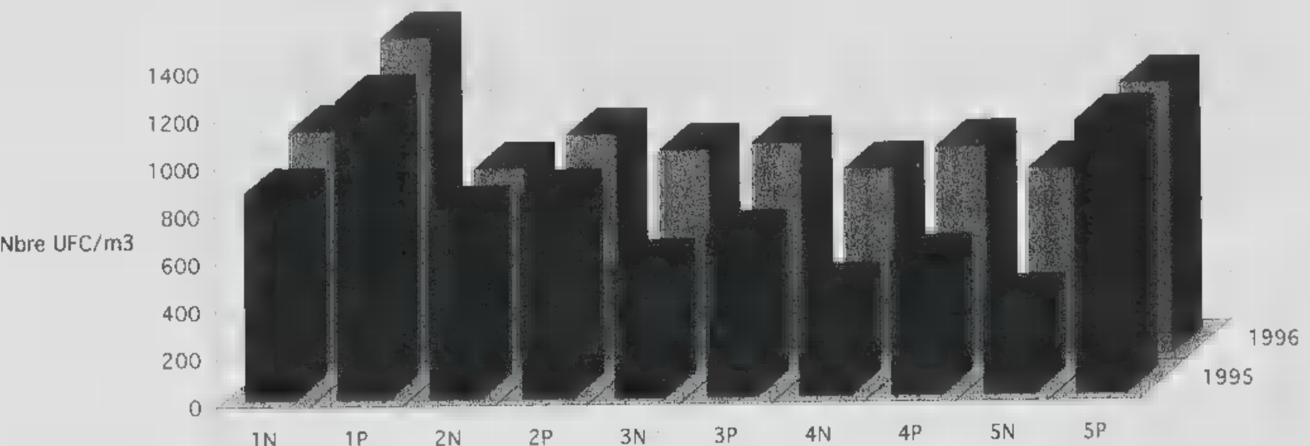


Fig. 1. — Aérocollecteur (AIRTEST). Distribution quantitative des UFC de l'air. Site pollué (P) et site non pollué (N). 5 hauteurs de prélèvements (de 0,5 en 0,5 m du bas vers le haut), numérotées de 1 à 5. Valeurs moyennes de 5 répétitions simultanées sur des points éloignés de 2 m. Septembre 1995 et 1996.

Fig. 1. — Aerocollector (AIRTEST). Quantitative distribution of CFUs (Colony Forming Units). Sites: P (polluted) and N (no polluted). 5 sampling heights (5 to 2.5 from bottom to top) numbered from 1 to 5. Mean values of 5 simultaneous replicates, on points distant by 2 m. September 1995 and 1996.

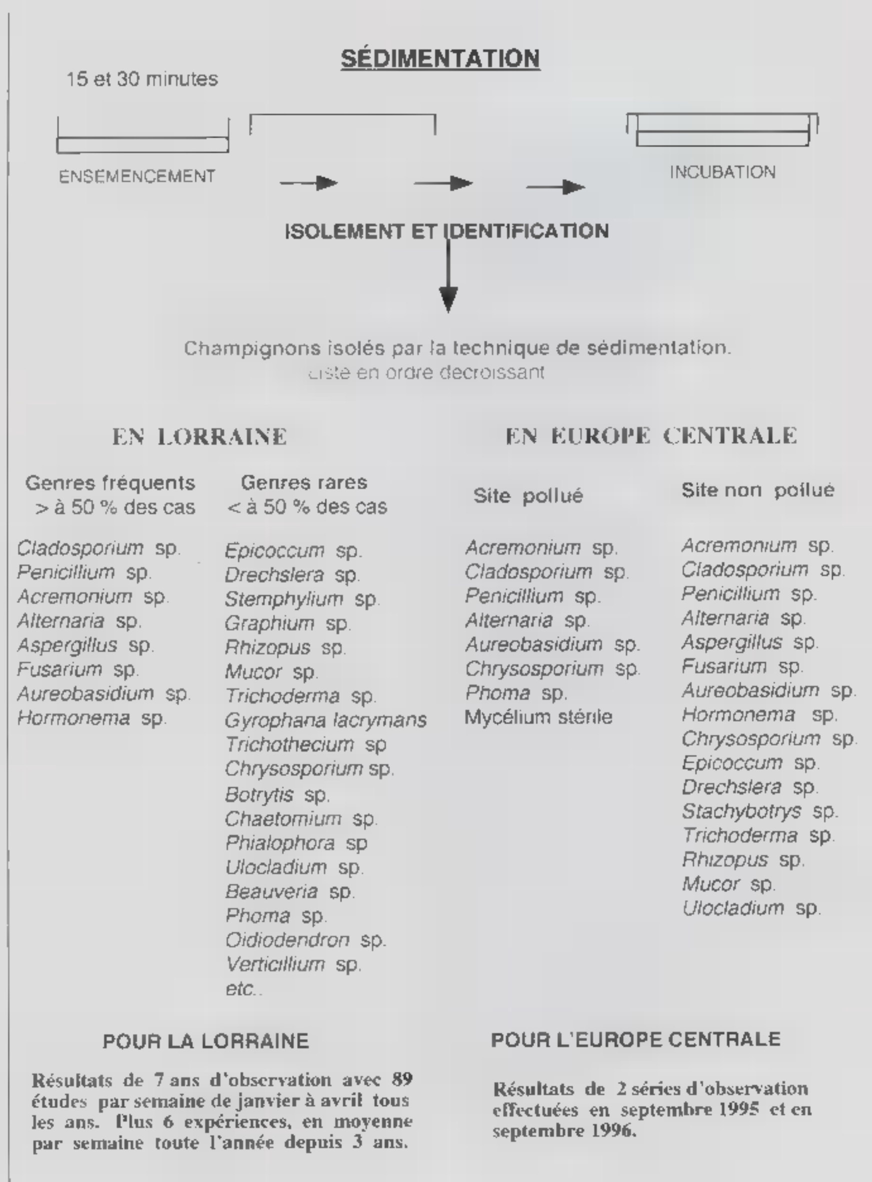


Fig. 2. — Sédimentation et culture. Flore fongique identifiée à partir des UFC de l'air des locaux en Lorraine et de l'air des sites de la figure 1.

Fig. 2. — Sedimentation and culture. Fungal flora identified from CFUs in air in Lorraine and in air of sites in Figure 1.

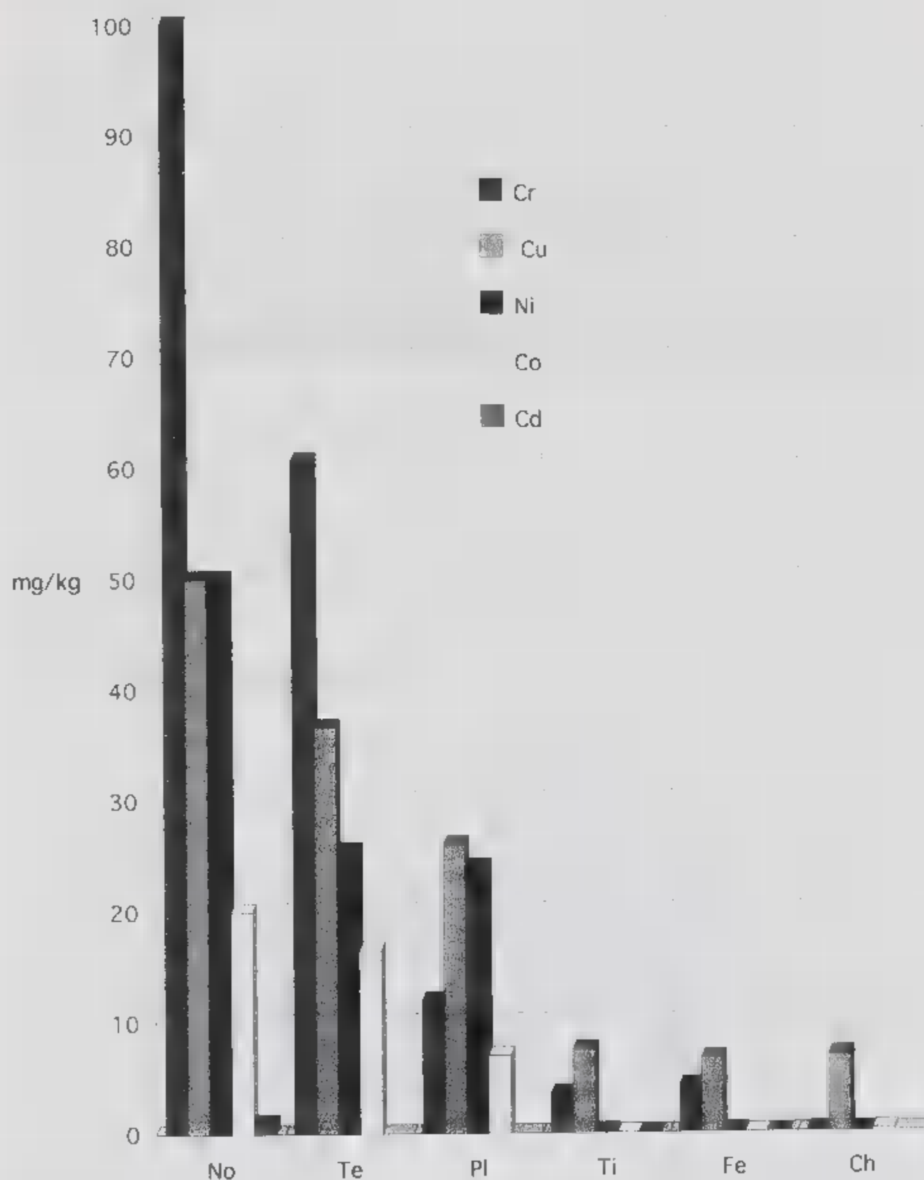


Fig. 3. — Charbon du maïs. En grande culture Transfert des métaux : sol-plante-parasite (*Uromyces maydis*).
(Ch=chlamydospores du parasite, Fe=feuilles, Ti=tiges (fin de végétation), Pl=plantules (40cm), Te=terre, No=normes).

Fig. 3. — In large-scale culture.Transfer of metals : soil-plant-parasite (*Uromyces maydis*).
(Ch = parasite chlamydospores, Fe = leaves, Ti = stem (end of growth), Pl = plantlets (40 cm), Te = soil, No = standard).

moyen (pour le champ étudié) est de 150 gr lors des infections précoces. Cette masse contient 1,4 mg de Cu et 0,02 mg de Ni. Les erreurs d'évaluation mises à part, il apparaît clairement que les chlamydospores contiennent à la place de l'épi, la quasi totalité des métaux cités qui deviennent ainsi exportables par voie aérienne. Nous reviendrons par ailleurs sur la signification possible de ce type de calculs. Pour d'autres métaux et plantes, la situation est variable. Ainsi les plantules de maïs ont un taux 3 fois supérieur à celui du sol en Se et Mo (Biro & Szilikovacs, comm. pers.). Par contre, toujours selon les mêmes auteurs, l'accumulation du Cd, Zn et Ni reste inférieure dans les mêmes plantules par rapport au taux relevé dans le sol. Nos résultats sont donc conformes à ceux des auteurs cités.

Transfert des métaux. Sol surchargé en polluants (cas d'*Ambrosia elatior*)

Le biotope étudié ici est une décharge industrielle dont le sol (boue) contient des taux inhabituellement élevés (même pour une décharge) de différents métaux. La végétation est dominée par *A. elatior* qui représente sur tous les sites semblables de la région la plante la plus tolérante.

La figure 4 réunit les données recueillies depuis 2 ans avec 2 prélèvements par an ; l'un effectué au mois d'août et l'autre au mois d'octobre. Pour équilibrer et rendre lisible le diagramme, nous avons divisé les valeurs des analyses du sol (Bu) par 10. Mêmes représentées ainsi, ces valeurs dépassent largement le taux « légal » des pays d'Europe Centrale.

Les résultats montrent que la concentration des métaux dans les différents types d'organes (racines = R, tiges = T, F = fleurs, P = pollens) augmente avec l'âge. Elle est souvent plus importante que le seuil de tolérance réglementaire (No) du sol.

Les grains de pollen, redoutables allergènes, contiennent également une charge notable. Ils constituent la fraction la plus disséminée de la plante. Cette dernière est réputée pour sa résistance aux parasites et ravageurs. Les grains de pollen portent cependant, dès leur libération, une microflore associée pauvre, constituée par des bactéries et des champignons. L'isolement, la caractérisation, l'évaluation quantitative et l'étude du comportement envers les métaux de ces microorganismes sont actuellement à l'étude.

Le cas d'*A. elatior* a été étudié en priorité à cause des besoins locaux de la Santé Publique. Le pays subit, en effet, depuis quelques années l'invasion de ce végétal du Sud vers le Nord. Parallèlement on enregistre une augmentation du nombre de consultations dans les Services Allergologie-Pneumologie des hôpitaux. L'apparition du pollen de cette plante, nouvel allergène pour la population autochtone, n'explique cependant pas dans tous les cas l'importance de l'augmentation numérique des symptômes enregistrés par les médecins. Le fait que les premières bases de l'installation de la plante sont des décharges et des terrains d'aviation ou industriels abandonnés justifie le développement des enquêtes axées sur ce problème.

L'efficacité de libération

Pour évaluer l'efficacité de la libération des métaux par action de la flore microbienne, nous avons utilisé des radis contaminés expérimentalement par le Ni, au-delà du taux normalement accepté pour les sols (50 mg/kg). Des lots de concentration différents en Ni servent en mélange pour l'obtention des tissus dont le taux du métal est ensuite déterminé. Cette démarche critiquable, respecte l'hétérogénéité habituelle de la nature où n'existe pas une contamination individuelle homogène. Elle impose cependant le

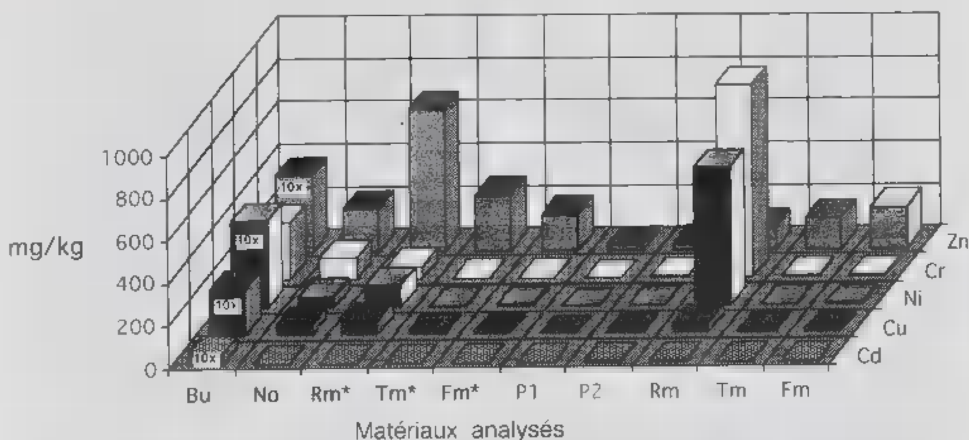


Fig. 4. — *Ambrosia elatior.* Prélèvements sur le terrain. Transfert des métaux : Sol (boue = Bu) — racines (R) — tiges (T) — fleurs (F) — pollens (P1 = pollen jeune, P2 = pollen âgé). m* = récolte au mois d'août, m = récolte au mois d'octobre.
Moyenne de 2 séries d'analyses.
Fig. 4. — *Ambrosia elatior.* Field samplings. Transfer of metals : Soils (Bu) — roots (R) — stems (T) — flowers (F) — pollens (P1 = young pollen, P2 = old pollen). m* = sampling in August, m = sampling in october.
Means of 2 series of analyses.

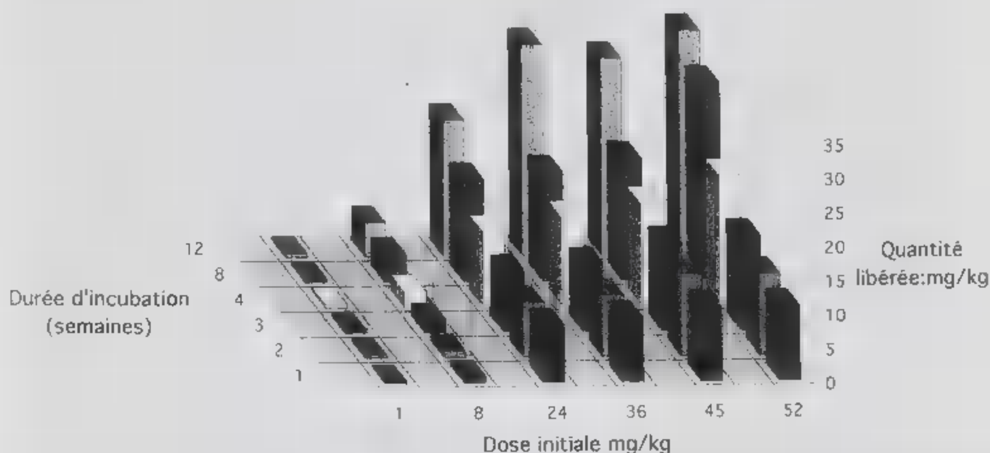


Fig. 5. — Expérimentation au laboratoire. Libération du Ni des tissus végétaux (radis) par biodégradation. Inoculation par des souches industrielles (brevet : Bully et Reisinger n° 9016248). Stérilisation à l'oxyde de propylène. Cultures stationnaires (témoin = 1mg/kg). Données non cumulées. Ni libéré est dosé dans le surnageant et dans les corps microbiens.
Fig. 5. — Laboratory experiment. Liberation of Ni from plant tissues (radish) by biodegradation. Inoculation by industrial strains (Patent : Bully et Reisinger n° 9016248). Sterilization with propylene oxide. Stationary cultures (control = 1mg/kg). No cumulate data. Liberated Ni is titrated in supernatant and in microbial bodies.

fractionnement des tissus dont la première conséquence est l'accélération des processus lytiques.

Le milieu liquide à base d'extrait de malt (0,1 %) et de traces d'extrait de levure est inoculé 24 heures avant l'immersion du matériel végétal. L'inoculum est un mélange de microorganismes réalisé pour les besoins de la dépollution industrielle (Bully & Reisinger, 1990). Il contient des bactéries et des champignons aptes à tolérer ou à prendre en charge divers contaminants, même organiques tels que les PCB.

Le dosage du Ni libéré dans le surnageant est réalisé 3 fois par semaine durant 3 mois. Les résultats obtenus (fig. 5), contenant également le Ni libéré spontanément, montrent peu de changement durant les 3 premières semaines et une accélération de la quantité de Ni libéré de la 4e à la 9e semaine. À ce stade, le matériel végétal est presque totalement décomposé et le taux de métal libéré reste constant durant les périodes suivantes. C'est à ce moment que l'on note également la stabilisation du taux du Ni (7-8 mg/l) dans la fraction fongique. Cette dernière, facile à récupérer, est la seule fraction microbienne analysée.

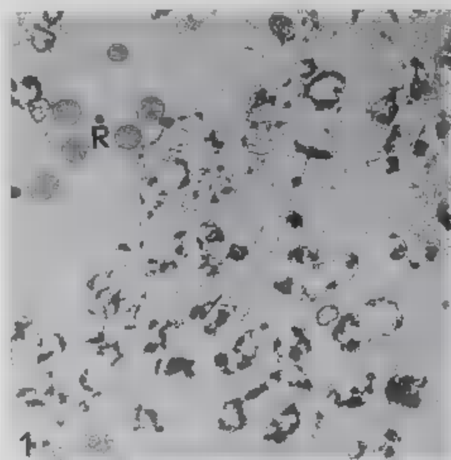
Localisation ultrastructurale des PCB dans les cellules microbiennes

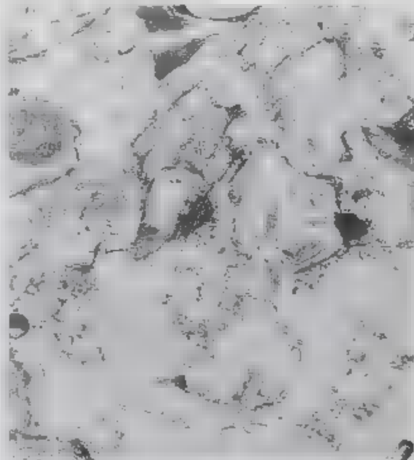
Les PCB, produits de synthèse très toxiques, peuvent être métabolisés ou immobilisés par certains microorganismes. Dans le premier cas, l'efficacité de la métabolisation est inversement proportionnelle au nombre de chlores de la molécule (Furakawa *et al.*, 1979). Dans le second, la bioimmobilisation, les produits mêmes très chlorés, donc non biodégradables, peuvent être neutralisés, au moins en partie, par une large fraction de la microflore (Bullyt, 1991).

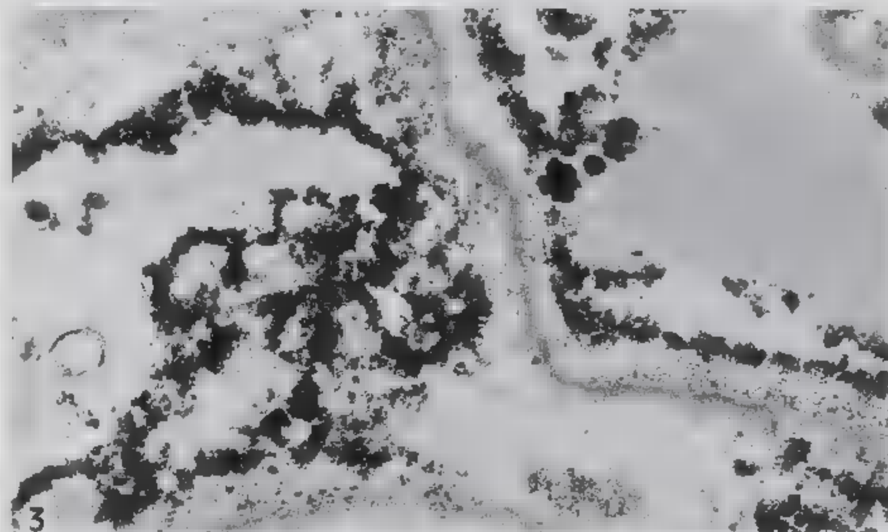
La réglementation actuelle concernant les PCB dans les milieux naturels est extrêmement sévère. Afin de pouvoir détecter ces produits masqués ou présents en faible quantité, nous avons utilisé la méthode proposée par Bully et Reisinger (1994).

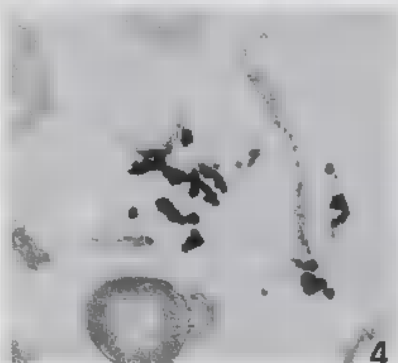
Planche 1 : **1** : Colonies bactériennes dans un sol pollué par les PCB. Souches résistantes (**R**).Les cellules vides de la souche sensible contiennent des granules denses aux électrons associés à des membranes ou situés généralement en position pariétale. Contraste : citrate de plomb. X = 12 000. **2** : Même échantillon que pour 1. Structures membranaires et résidus de paroi microbienne. Noter l'absence des granules denses aux électrons. Contraste : Mise en évidence des substances de nature polyosidique. X = 16 000. **3** : Débris de paroi fongique et produits denses aux électrons. Noter la présence de granulations de petite taille, denses aux électrons, situées dans l[SA]enveloppe cellulaire. Contraste : citrate de plomb. X = 24 000. **4** : Granules denses aux électrons associés à des produits structurés, probablement résidus de parois bactériennes. Contraste : citrate de plomb. X = 31 000. **5** : Paroi fongique obtenue en culture liquide dépourvu de PCB. Contraste : Mise en évidence des substances de nature polyosidiques. X = 18 000

Plate 1 : **1** : Bacterial colonies in a soil polluted by PCBs. Resistant strains (**R**). Empty cells of the sensitive strain contain electron-dense granules associated with membranes or generally situated in parietal position. Contrast : Lead citrate. X = 1 200. **2** : Same sample as in Fig. 1. Membranous structures and remains of microbial wall. Note the absence of electron-dense granules. Contrast : for polyosidic substences. X = 1 600. **3** : Remains of fungal wall and electron-dense products. Note the presence of small, electron-dense granules, in the cell envelope. Contrast : Lead citrate. X = 24 000. **4** : Electron-dense granules associated with structured substences probably bacterial wall remains. Contrast : Lead citrate. X = 31 000. **5** : Fungal wall obtained in liquid culture medium without PCBs. Contrast : for polyosidic substences. X = 18 000









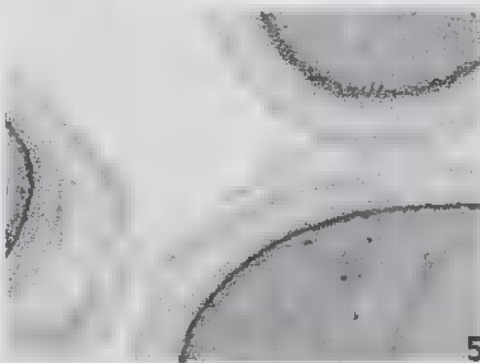


PLANCHE I

Les examens ultrastructuraux au Microscope Électronique à Transmission (MET) révèlent dans les échantillons contenant des PCB des granules denses aux électrons de taille et de forme variable (Planche I, figures 1, 3 et 4). Ces granules présents sur des coupes non contrastées ou contrastées au citrate de plomb font défaut dans les témoins (Planche I, fig. 5) et sur les sections ultrafines, soumises à la technique de mise en évidence des polyosides (Planche I, fig. 2). La détection des PCB par chromatographie à chacune des étapes de la méthode de Thiery sur un matériel identique montre que l'agent responsable de l'extraction est le thiocarbohydrazide. L'utilisation de ce dernier améliore d'ailleurs de manière notable la sensibilité des analyses chimiques. Les données rapportées ci-dessus démontrent de nouveau et clairement que les granules observés au MET représentent bien les PCB ou au moins une fraction de ceux-ci.

D'autres images telles que celle de la figure 3 de la Planche I, permettent de montrer la migration de ces granules à travers la paroi et leur fractionnement à l'intérieur de celle-ci ou dans le cytoplasme. Cette migration, condition essentielle de la réussite de la bioimmobilisation est possible grâce à l'existence de « puits » de structure chimique différente dans l'enveloppe cellulaire (Reisinger *et al.*, 1977). C'est en se basant sur la nature lipophile des PCB et sur la quantité de lipides pariétaux de quelques germes que nous avons effectué un premier choix de microorganismes actuellement expérimentés en tant que biocapteurs et bioindicateurs.

La sensibilité de cette méthode bien que longue et coûteuse garantit la démonstration indiscutable de la présence des PCB, strictement prohibés dans certains milieux.

CONCLUSIONS

Malgré la multiplicité des techniques employées rapportées ou non ici nous rencontrons beaucoup de difficultés pour situer et discuter la valeur de nos résultats. La cause principale en est bien entendu l'absence de travaux semblables donc de données bibliographiques cohérentes. À ceci s'ajoute le manque d'une législation précise ou variable d'un pays à l'autre rendant impossible la détermination du taux où commence la notion « légale » de la pollution. Nos données doivent donc être manipulées avec beaucoup de prudence. Ainsi nous avons effectué et à titre uniquement indicatif une évaluation des métaux dans les chlamydospores de *Ustilago maydis* obtenues à partir d'une culture de maïs absolument normal, excepté bien entendu sa forte contamination par le parasite fongique. Les propagules contiennent donc des métaux. Sont-elles pour autant plus dangereuses que celles qui en contiennent moins ou plus ?

Nous pouvons cependant accepter définitivement, comme prévu d'ailleurs, que l'exportation des métaux ou des polluants organiques est réalisée régulièrement par voie aérienne via les propagules d'origine végétale et microbienne. Il en est de même pour les éléments de la microfaune qui peuvent prélever ces organes ou d'autres par choix trophique (microarthropodes mycophages par exemple) et les transporter dans leur tractus digestif ou simplement par adhésion mécanique sur leur corps.

Dans un premier temps et schématiquement, ces facteurs réalisent une dispersion des matériaux étudiés dans l'espace environnant. Des concentrations inhabituelles de ces organes, donc des métaux ou des polluants, peuvent ensuite intervenir dans les pelotes fécales ou dans les tractus respiratoires des animaux autochtones, donc souvent à des niveaux où la notion « dose-effet » perd sa signification. Des études et des enquêtes sont prévues pour tenter de préciser les modifications induites dans l'environnement, par la qualité et la quantité de cette nouvelle génération de propagules.

L'existence d'une réglementation plus précise rend cependant le cas des PCB quelque peu différent. Ces substances sont considérées dans certains milieux (l'eau par exemple) comme très dangereuses même en concentration faible. Leur présence dans et/ou sur certaines cellules microbiennes est démontrée avec certitude. Comme les propagules non modifiées, ces cellules sont donc susceptibles d'être disséminées par voie aérienne. La réalité de cette dissémination n'est pas encore expérimentalement démontrée, mais aucune raison logique ne s'oppose à cette éventualité.

BIBLIOGRAPHIE

AL MAHMOOD S., GIUMMELY P. & BONALY R., 1987 — Structural modifications of mannans during flocculation of *Kluyveromyces bulgaricus*. *Applied microbiology and biotechnology* 26 : 462-467.

BARTNICKI-GARCIA S., 1968 — Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual review of microbiology* 22 : 87-108.

BARTNICKI-GARCIA S. & LIPPMAN E., 1982 — *Fungal cell wall composition*. CRC Handbook of Microbiology IV : 229-252.

BONALY R. & REISINGER O., 1971 — Études des modifications chimiques et ultrastructurales de la paroi de trois levures du genre *Rhodotorula* cultivées sur deux milieux différents. *Comptes rendus académie des sciences, D, Paris* 272 : 2309-2312.

BULLY F., 1991 — *Traitement par voie biologique de composés toxiques contaminant les milieux naturels*. Thèse de Doctorat. Université de Nancy I, 155 pp.

BULLY F. & REISINGER O., 1990 — *Composition pour la décontamination des sols pollués. Procédé et dispositif pour l'utilisation de cette composition*. Brevet, E.M.C.. SERVICES, N° 493248, EP.

BULLY F. & REISINGER O., 1994 — Relations des polychlorobiphényles (PCBs) avec des microorganismes. Mise en évidence et évolution ultrastructurale. *in* Balàzsy & Reisinger. Environmental Microbiology, 117-124.

MBAWALA A., AL MAHMOOD S., LOPPINET V. & BONALY R., 1990 — Acetolysis and 1 H NMR studies on mannans isolated from very flocculent and weakly flocculent cells of *Pichia pastoris* IFP 206. *Journal of general microbiology* 136 : 1279-1284.

MONERET-VAUTRIN D.A., 1997 — Les allergènes alimentaires et leurs modifications par les technologies agro-alimentaires. *Cahiers d'agricultures* 6 : 21-29.

REISINGER O., KIFFER E., MANGENOT F. & OLAH G.M., 1977 — Ultrastructure, cytochimie et microdissection enzymatique de la paroi des hyphes et des propagules exogènes des Ascomycètes et Basidiomycètes. *Revue de mycologie* 41 : 91-117.

REYNOLDS E.S., 1963 — The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of cell biology* 17 : 208-212.

THIERY J.P., 1967 — Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal de microscopie* 6 : 987-1017.

ZAAMOUN S., TRAN THI, REISINGER O., GUIRAUD J.P., FONTANA A.& BONALY R., 1995. — Influence of aeration and (rho°) mutation on the structure of the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces diastaticus*. *Mycological research* 99 : 492-500.

Source : MNHN, Paris

RÔLE DU MODE DE FORMULATION SUR LA SURVIE ET L'ACTIVITÉ ANTAGONISTE D'AGENTS DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES FUSARIOSES DE PLANTES CULTIVÉES.

C. STEINBERG, V. EDEL, C. ALABOUVETTE
INRA-CMSE, Laboratoire de Flore Pathogène du sol,17 rue Sully, BV 1540, 21034 Dijon Cedex. Email : steinberg@dijon.inra.fr

Parmi les maladies cryptogamiques dont sont affectées les plantes maraîchères et les plantes horticoles, la fusariose vasculaire, trachéomycose due aux formes pathogènes (*formae speciales*) du champignon *Fusarium oxysporum*, est l'une des plus problématiques car il n'existe pas à ce jour de moyen de lutte chimique spécifique. La lutte biologique faisant appel à la compétition entre d'un coté la forme pathogène spécifique de *Fusarium oxysporum* et de l'autre, une forme non pathogène appartenant à la même espèce en présence ou non de bactéries du genre *Pseudomonas* donne des résultats satisfaisants dans les conditions de culture sous serre en substrat artificiel et en sol désinfecté (Alabouvette *et al.*, 1993). Cependant, l'utilisation de micro-organismes en lutte biologique suppose une inoculation des souches antagonistes dans le substrat de culture, préalablement au semis ou au repiquage. De plus, tous les sols maraîchers ne sont pas systématiquement désinfectés. Les souches introduites dans ces sols sont donc confrontes, outre l'adversité des facteurs abiotiques, aux mécanismes de régulation liés à la présence des micro-organismes indigènes (prédation, compétition pour le substrat ou l'espace, antibiose...) (Alabouvette & Steinberg, 1995).

L'efficacité de la lutte biologique contre les fusarioses repose donc sur deux composantes principales au moins : (i) une réelle activité antagoniste des agents de lutte biologique en situation de production agricole, (ii) un système d'application qui permette l'expression de cette activité.

(i) L'activité antagoniste de la souche non pathogène de *Fusarium oxysporum* Fo47 et de la souche *de Pseudomonas fluorescens* C7r12, utilisées seules ou en association contre des formes pathogènes de *F. oxysporum* a été démontrée (Lemanceau & Alabouvette, 1991).

(ii) Afin de définir un système d'application optimum, des inoculums de Fo47 et de C7r12 ont été préparés en utilisant différents supports de formulation : liquide, talc, microgranulés et microgranulés enrichis en substrat C et N. Ce dernier mode de formulation a été récemment décrit et utilisé avec succès pour l'inoculation de *Bradyrhizobium japonicum* à des cultures de soja (Fouilleux *et al.*, 1996). Dans le cas des supports de formulation liquide et microgranulés, enrichis ou non, les deux agents de lutte biologique ont été apportés seuls, en association dans le même support de formulation ou bien en combinaison de deux inoculums formulés séparément. Dans tous les cas, la survie des

agents de lutte biologique introduits dans des sols désinfectés ou naturels ■ été appréciée par dénombrement sur milieu sélectif en boîte de Pétri. L'activité antagoniste des souches Fo47 et C7r12 introduites en sols naturels ou désinfectés par les différents systèmes de formulation a été mesurée par des tests biologiques sur lin en présence d'une souche de *F. oxysporum* pathogène du lin.

La survie des populations bactériennes et fongiques introduites en sol naturel selon différents modes de formulation est représentée respectivement figures 1 et 2 et l'activité antagoniste de ces populations est représentée figures 3 et 4. La meilleure survie des inoculums de C7r12 est obtenue avec les microgranulés enrichis en substrat C+N comparée à celle obtenue en utilisant la formulation liquide classique et surtout le support microgranulés non enrichis, aussi bien en sol naturel qu'en sol désinfecté (fig.1). Les formulations talc et support microgranulés non enrichis présentent des avantages pratiques de préparation et conservation mais ne peuvent être envisagés que pour des inoculums fongiques et ne permettent pas une mise en activité suffisamment rapide de la population de Fo47 notamment en sol naturel (fig.2). Le support microgranulés enrichis favorise le développement des populations introduites en sol naturel et désinfecté. Il permet surtout une mise en activité très rapide de la population de Fo47 qui est capable de croître en sol naturel et assure de ce fait une meilleure protection des plantes vis-à-vis du pathogène (fig. 3). De même, en stimulant la croissance bactérienne, l'utilisation du support microgranulés enrichis renforce l'interaction positive Fo47-C7r12 quel que soit le support de formulation adopté pour Fo47 en combinaison avec C7r12.

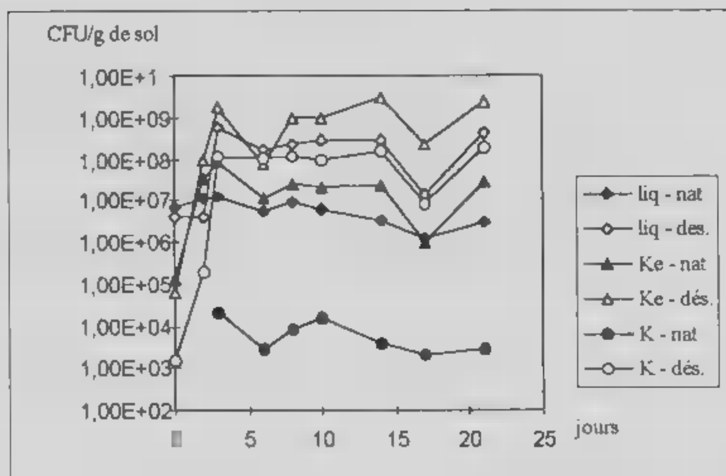


Fig. 1. — Dynamique des populations de C7r12 introduites en sol naturel (nat) ou désinfecté (dés) à l'aide de différents modes de formulation : liquide (liq), microgranulés (K), microgranulés enrichis (Ke).

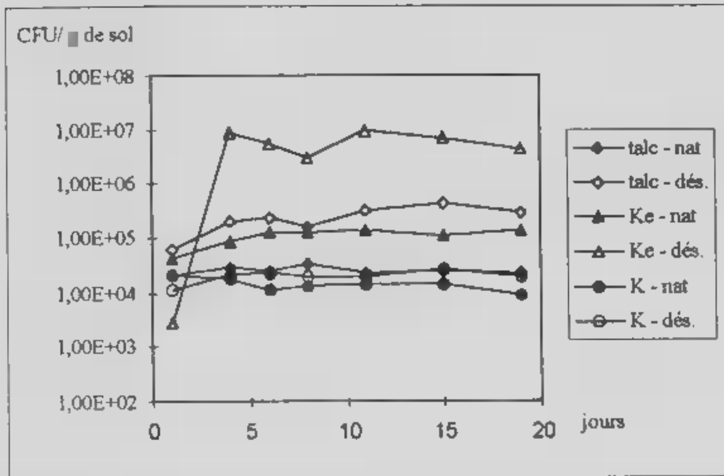


Fig. 2. — Dynamique des populations de Fo47 introduites en sol naturel (nat) ou désinfecté (dés) à l'aide de différents modes de formulation : liquide (liq), microgranulés (K), microgranulés enrichis (Ke).

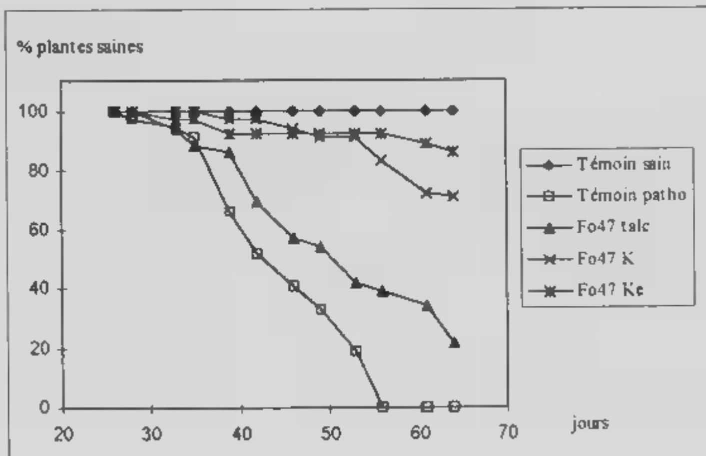


Fig. 3. — Activité antagoniste de la souche de *F. oxysporum* non pathogène Fo47 vis-à-vis de la souche pathogène du lin Foln3. La souche non pathogène est introduite dans le sol naturel selon différents modes de formulation : talc, microgranulés (K), microgranulés enrichis (Ke) à une dose de 10^5 propagules /g de sol. L'activité antagoniste est exprimée en pourcentage de plantes saines.

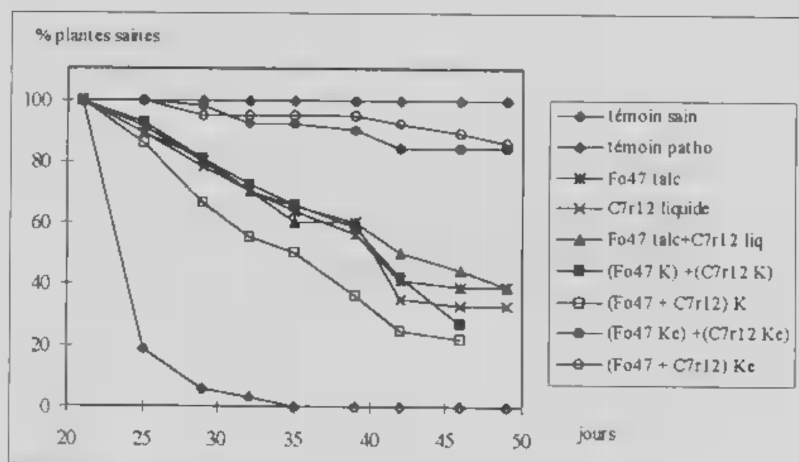


Fig. 4. — Activité antagoniste de la souche Fo47 et de la souche C7r12 vis-à-vis de la souche pathogène du lin Foln3. Les agents de lutte biologiques sont introduits en sol naturel, seuls ou en combinaison selon différents modes de formulation : liquide (liq), talc, microgranulés (K), microgranulés enrichis (Ke) à une dose de 10^5 propagules de Fo47 et 10^8 CFU de C7r12 /g de sol.

Cependant cet effet synergique est plus important lorsque les deux agents de lutte biologique sont introduits ensembles mais sous forme de deux inoculums séparés (fig. 4). Lorsque les deux populations sont introduites en sol désinfecté dans le même support de formulation, elles entrent en compétition mutuelle pour le substrat, ce qui affecte leur croissance dans le sol et diminue leur activité antagoniste. En sol naturel, l'adversité des facteurs biotiques minimise l'influence de cette compétition, ce qui se traduit par une activité antagoniste équivalente des combinaisons Fo47-C7r12. La meilleure protection est cependant obtenue quand les microgranulés enrichis sont utilisés comme support de formulation (fig. 4). Les inoculums bactériens et fongiques doivent donc être préparés séparément et mélangés avant l'introduction dans le sol, ce qui est compatible avec leur mode de production et les conditions pratiques d'application en sol naturel comme en substrat de culture désinfecté.

RÉFÉRENCES

ALABOUVETTE C., LEMANCEAU P. & STEINBERG C., 1993 — Recent advances in biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticide science*, 37 : 365-373.

ALABOUVETTE C. & STEINBERG C., 1995 — Suppressiveness of soils to invading microorganisms. *In* : H. Hokkanen and J.M. Lynch (eds), Benefits and risks of introducing biocontrol agents, Cambridge University Press, pp 3-12.

FOUILLEUX G, REVELLIN C, HARTMANN A. & CATROUX G., 1996 — Increase of *Bradyrhizobium japonicum* numbers in soils and enhanced nodulation of soybean (*Glycine max* L. Merr.) using granular inoculants amended with nutrients. *FEMS microbial ecology* 20 : 173-183.

LEMANCEAU P. & ALABOUVETTE C., 1991 — Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non pathogenic *Fusarium*. *Crop protection* 10 : 279-286

Source : MNHN, Paris

INTERÊT DU *PYTHIUM OLIGANDRUM* DANS UNE PERSPECTIVE DE PROTECTION INTEGREE CONTRE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *RADICIS-LYCOPERSICI* EN CULTURES HORS-SOL DE TOMATE.

P. REY[1], N. BENHAMOU[2], J. HOCKENHULL[3] et Y. TIRILLY[1]

[1]ESMISAB,
Laboratoire de Microbiologie et Sécurité Alimentaire,
Université de Bretagne Occidentale,
Technopôle Brest-Iroise,
29280 Plouzané, France.
[2]Recherche en Sciences de la Vie et de la Santé,
Pavillon Charles-Eugène Marchand,
Université Laval, Sainte-Foy,
Québec, Canada, G1K 7P4
[3]Department of Plant Biology,
the Royal Veterinary and Agricultural University,
40 Thorvaldsensvej, DK-1871 Frederiksberg,
Copenhague, Danemark.

Le choix de variétés sensibles au *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*FORL*) reste important en cultures hors-sol de tomates. Ce risque accepté est associé à une volonté de réduction des intrants chimiques.

Outre la prophylaxie, la lutte biologique a retenu l'attention. Les principaux antagonistes microbiens testés sont *Streptomyces griseo-viridis*, *Trichoderma harzianum*, des souches non pathogènes de *Fusarium* sp. et plusieurs souches de *Pseudomonas* fluorescents. Selon le micro-organisme retenu et les conditions d'essais, les résultats sont variables. Une seconde approche consiste à associer des antagonistes avec un objectif d'effets synergistes (ex. *F.o.* 47 et *Pseudomonas* sp.). Il apparaît, à ce niveau, important de recenser les différents micro-organismes utilisables en protection intégrée dans le cadre d'une introduction en cultures hors-sol.

La présence de *Pythium* mycoparasites de *Fusarium* sp. ou d'autres *Pythium* a été signalée dans la rhizosphère des cultures de tomates en hors-sol. Le *Pythium oligandrum* est l'un de ces antagonistes. Toutefois, les récentes études sont en défaveur d'une suffisante efficacité du mycoparasitisme que peut exercer cette espèce dans la rhizosphère des tomates ou concombres.

Au cours de ces travaux, nous avons observé, pour la première fois, l'aptitude de *P. oligandrum* à pénétrer dans les tissus racinaires sans provoquer de symptômes visibles

d'altération. De ce fait, l'étude des relations *P. oligandrum* — tomate a été privilégiée. Dans nos conditions expérimentales, les hyphes sont observées dans les différents tissus, y compris le xylème, la colonisation restant, cependant, réduite. Dans les 3 à 4 jours qui suivent l'infection, la majorité (90 %) des structures fongiques offrent des signes prononcés de dégénérescence. Cette dégradation est associée avec le déclenchement de fortes réactions de défense observables en microscopie électronique : production de substances apparentées à des composés phénoliques, de papilles et d'appositions pariétales.

Afin de vérifier si les réactions de défense induites pouvaient accroître la résistance des plants de tomate à une attaque ultérieure par un agent infectieux, nous avons procédé à des apports décalés de *P. oligandrum* puis de *FORL*. L'utilisation en analyses ultrastructurales de sondes sélectives a permis de détecter certaines cibles végétales et de différencier le *Pythium* (paroi cellulosique) du *FORL* (paroi chitineuse).

Dans les conditions de notre expérimentation, tous les tissus racinaires des plants témoins sont envahis par les hyphes de *FORL*. Cette colonisation est accompagnée d'une désorganisation du contenu cytoplasmique des cellules hôtes envahies ainsi que par des altérations marquées au niveau des parois végétales. La plante ne semble pas émettre de réactions de défense (ou à un niveau très faible) pour contrer l'avancée de l'agent pathogène.

À l'inverse, chez les plants inoculés au préalable par *P. oligandrum*, plusieurs phénomènes vont conduire à une protection locale importante contre *FORL*. Tout d'abord, l'étendue de la colonisation fusarienne est extrêmement limitée. Elle est réduite aux cellules épidermiques ou aux couches cellulaires adjacentes. Les hyphes de *FORL* font souvent face à des structures pariétales telles que des appositions et des papilles. Ce sont souvent des structures compactes, massives, parfois enrichies en matériaux phénoliques, qui renforcent les parois végétales. La plupart du temps, les hyphes de *FORL* sont retardées voire arrêtées dans leur progression au niveau de ces parois renforcées. De plus, une accumulation de matériaux de nature phénolique crée un environnement fongitoxique qui conduit à une dégénérescence des filaments de *FORL*. Les observations sont en faveur d'une intervention postérieure de chitinases et glucanases dont l'activité compléterait les effets des métabolites toxiques.

En outre, il apparaît clairement que le *P. oligandrum* peut exercer une action hyperparasitaire par pénétration et destruction, *in planta*, des cellules du *FORL*. Ainsi, pour la première fois, il a été montré l'induction d'une résistance locale par *P. oligandrum* dont l'effet est accru par une aptitude hyperparasitaire

Ces premiers résultats conduisent à étendre les études sur les relations *P. oligandrum* — tomate dans l'objectif d'analyser plus précisément l'intérêt d'élargir à ce champignon le recours combiné à différents antagonistes en vue d'une protection intégrée.

ACTION FONGISTATIQUE ET FONGICIDE DE SIX BIOCIDES UTILISÉS DANS LE TRAITEMENT DE BOIS ARCHÉOLOGIQUES CONTAMINÉS.

P. GUIRAUD *, J.L. BENOIT-GUYOD *, R. STEIMAN *, Q.K. TRAN **

* Groupe pour l'Étude du Devenir des Xénobiotiques dans l'Environnement (GEDEXE), UFR de Pharmacie de Grenoble (UJF), BP 138, 38243 Meylan Cedex, France.
** ARC Nucléart, Centre d'Études Nucléaires de Grenoble, BP 85X, 38041 Grenoble Cedex, France

RÉSUMÉ — Les bois archéologiques gorgés d'eau sont très sensibles à l'attaque par les microorganismes. Un bateau datant de 1680 a été exhumé en juin 1990 à Bouliac près de Bordeaux (France). Sa restauration a été confiée à l'équipe de ARC Nucléart à Grenoble (France), spécialisée dans le développement de procédés de conservation d'objets archéologiques. Malgré de nombreuses précautions, des moisissures se sont développées sur différentes parties du bateau en février 1994. En dépit d'un reconditionnement du bois, ces moisissures sont réapparues très rapidement. Différents échantillons ont été prélevés, aussi bien dans les zones visiblement contaminées, que dans des zones sans contamination apparente. La sensibilité de 7 espèces, représentatives des différents groupes taxonomiques présents, a été recherchée vis-à-vis de 6 biocides commerciaux contenant différentes classes de matières actives, en prenant pour référence le pentachlorophénol. Les concentrations minimum inhibitrices et létales ont été déterminées.

ABSTRACT — Numerous microorganisms grow on waterlogged archeological woods leading to their deterioration. Microbial proliferation should be avoided by the use of one or several biocides. In a previous study, we surveyed the mycoflora found in a waterlogged boat from the end of the 17th century, discovered in 1990 near Bordeaux (Bouliac, France). In this work, 7 species, representative of the different taxonomic groups isolated and identified from small wood samples, have been checked for their sensitivity towards six commercial biocides containing various classes of active compounds. The minimal inhibitory concentrations and the minimal lethal concentrations have been determined for each biocide.

MOTS CLÉS : Bois archéologiques, dégradation, micromycètes, moisissures, conservation

KEY WORDS : Archeological wood, degradation, micromycetes, preservation

INTRODUCTION

La préservation et la restauration des objets archéologiques, historiques et des objets d'Art est un problème très complexe en raison de la multitude des types d'agressions possibles et également de la diversité des matériaux à protéger. Plusieurs centres de recherche se sont spécialisés dans ce domaine.

Nucléart est un service du Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), implanté au Centre d'Études Nucléaires de Grenoble (CENG) et lié à l'Atelier Régional de Conservation (ARC), formant le groupe ARC-Nucléart. Ce groupe est spécialisé dans le traitement et la restauration d'objets archéologiques, en particulier les bois gorgés d'eau. Différents procédés sont utilisés : le séchage par lyophilisation après imprégnation par du polyéthylèneglycol (PEG) (Young & Wainwright, 1982 ; Cook & Grattan, 1984 ; Hoffmann, 1984 ; Jannière & Meurgues, 1984), la consolidation selon le procédé Nucléart (imprégnation par des résines styrène-polyester puis polymérisation par irradiation gamma) ou imprégnation partielle ou totale par des polymères synthétiques (de Tassigny & Ginier-Gillet, 1979 ; Ginier-Gillet *et al.*, 1984).

Le problème majeur est le stockage des pièces avant traitement car sorties de leur milieu d'immersion, les matériaux organiques sont altérés rapidement par les nouvelles conditions physico-chimiques dans lesquelles ils se trouvent (oxydations...) ainsi que par les insectes et les microorganismes. La procédure la mieux adaptée consiste à essayer de maintenir au mieux les conditions dans lesquelles ont été découvertes les pièces, en les plaçant en milieu immergé à l'obscurité. Cependant, il est souvent plus facile de stocker les bois gorgés d'eau dans des gaines étanches saturées en eau en chambre froide à 6° C. Dans ce cas, les contaminants présents lors du conditionnement peuvent se développer si l'on n'utilise pas des techniques de désinfection ou de stérilisation telles que des biocides chimiques ou bien les radiations gamma (Pointing *et al.*, 1994). Les bois archéologiques gorgés d'eau sont donc la cible de nombreux microorganismes (bactéries et micromycètes) susceptibles de les dégrader. L'emploi d'une ou de plusieurs méthodes biocides de différentes natures permet, en principe, de stopper la prolifération microbienne soit par un effet inhibiteur, soit par un effet létal.

Dans ce travail, nous avons testé l'efficacité de plusieurs biocides chimiques couramment utilisés contre différentes espèces de micromycètes isolés à partir de bois gorgé d'eau. L'influence du PEG a été étudiée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le bateau de Bouliac :

En juin 1990 à Bouliac près de Bordeaux, deux embarcations de bois gorgé d'eau ont été exhumées. L'une datant de 1680, la plus grande, a été confiée pour traitement à Arc-Nucléart à Grenoble. Le matériau dans lequel se trouvaient les bateaux est hétérogène, il s'agit d'argile, de sable, de graviers et de blocs de pierres. Dès leur exhumation, l'arrosage a été régulier pour éviter le dessèchement. La grande embarcation a été démontée, les fragments ont été lavés sur place puis enrobés de linges humides et conditionnés dans de la gaine étanche de polyéthylène noire pour la protection contre les rayons solaires. Une solution de biocide (Bactolyse) est introduite puis la gaine est soudée par thermocollage.

Les pièces seront ensuite stockées en chambre froide à +6° C au CENG, jusqu'en février 1994 date à laquelle il est noté un développement de moisissures sur de nombreuses pièces ornées de clous qui ont troué la gaine. Les pièces sont alors reconditionnées (souvent dans les mêmes gaines) après nettoyage et pulvérisation d'une solution de Bactolyse à 1 %. Malgré ces précautions, des microorganismes réapparaissent même lorsque la gaine a été changée et des prélèvements sont effectués en avril 1994 sur différentes parties du bateau.

Espèces fongiques étudiées :

Parmi les micromycètes isolés des prélèvements de bois effectués en 1994, sept ont été étudiés : un Ascomycète : *Chaetomium globosum* Kunze : Fries ; un Basidiomycète : *Pholiota abstrusa* (Fries) Singer *sensu* Singer ; cinq Deutéromycètes : *Acremonium persicinum* (Nicot) W. Gams, *Gliocladium virens* J.H. Miller *et al.*, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Phialophora lignicola* (Nannfeldt) Goidanich et *Trichoderma viride* Persoon : Fries.

Biocides utilisés :

Les biocides testés sont des composés à large spectre (algicides, bactéricides, fongicides), commercialisés en solution aqueuse : Bactolyse 48 (B48) est un mélange de deux dérivés isothiazoline et de nitrate de cuivre, Bactolyse 66 (B66) est un mélange de deux dérivés isothiazoline et d'un dérivé bromo-nitré, Kathon CG contient les mêmes principes actifs que B48 mais 10 fois plus dilués. Luxor D2 est un ammonium quaternaire et JB75 est un sel de phosphonium. Le produit antifongique de référence est le sel de sodium du pentachlorophénol (PCPNa). Les produits sont testés à des concentrations finales de 0,01 à 3 g/l sauf le JB75 : de 1 à 60 g/l (g de solution commerciale dans de l'eau distillée stérile). Ces gammes de concentrations sont préparées de manière à encadrer la concentration d'utilisation préconisée par le fabricant (0,1 % soit 1 g/l pour B48, 1 à 5 % soit 10 à 50 g/l pour JB75).

B48, B66 et JB75 proviennent de chez JOUD, France ; Kathon CG de chez ROHM et HAAS (Allemagne), Luxor D2 de chez VIATIK (France) et PCPNa de chez ALDRICH (Allemagne).

Essais préliminaires :

Pour deux des espèces choisies (*Gliocadium virens* et *Trichoderma viride*), l'action de B48 (0,25 à 3 g/l) et de JB75 (10 à 30 g/l) a été étudiée sur un milieu solide (glucose 8 %, extrait de levure 1,5 %, agar 1,5 %). Les micromycètes ont été ensemencés en un point central dans les boîtes de Pétri puis la croissance a été évaluée par mesure du diamètre des colonies lors d'une incubation à 22° C pendant 15 jours sous un éclairage type lumière du jour avec une photopériode de 12h/24h.

Détermination des CMI et CML :

Pour chaque espèce, des précultures sont réalisées en boîte de Pétri sur milieu malt (1,5 %) -agar (1,5 %) (MEA) pendant 8 à 10 jours à 22° C. Puis des suspensions calibrées de spores sont préparées : 10^6 spores/ml dans de l'eau distillée stérile additionnée de tween 80 (0,5 %). Les tests de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont réalisés en plaques multipuits (96 puits). Chaque puits contient 170 ml de milieu synthétique de Galzy et Slonimski (1957) (5 g/l de glucose) additionné ou non de 20 % de PEG 400, 10 ml de suspension de spores, 20 ml de solution de biocide ; chaque essai est répété 8 fois (une colonne) ; le blanc correspond à une colonne ne contenant que du milieu de culture ; la colonne témoin ne contient pas la solution de biocide. Les microplaques sont ensuite incubées à 22° C sous agitation (180 rpm) et la croissance est évaluée par mesure de la densité optique à 620 nm à 24, 48 et 72h (spectrophotomètre Multiscan). Les concentrations minimales létales sont déterminées après transfert du

contenu des puits à 72h de culture sur milieu MEA en boîtes de Pétri et observation du développement de colonies ou non.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les 7 micromycètes étudiés ont été choisis comme représentants des différents groupes taxonomiques présents sur les échantillons de bois archéologique gorgé d'eau et en fonction de la fréquence de leur isolement. Toutes ces espèces sont ubiquistes, trouvées dans le sol mais fortement liées au bois ou à ses sous produits.

En ce qui concerne les biocides utilisés, le PCPNa est très couramment employé dans des domaines très divers : industrie, agriculture... mais il présente l'inconvénient de s'accumuler dans les écosystèmes et sa toxicité n'est pas négligeable. Les 5 autres produits testés sont présentés comme moins nocifs. Un traitement par du PEG est employé lors de la déshydratation ménagée des objets en bois gorgé d'eau. Ce traitement consiste à immerger les pièces de bois dans des solutions aqueuses de PEG en concentration croissante, chaque immersion est très lente et peut durer plusieurs mois, c'est pourquoi l'influence de ce produit sur l'efficacité des biocides a été recherchée.

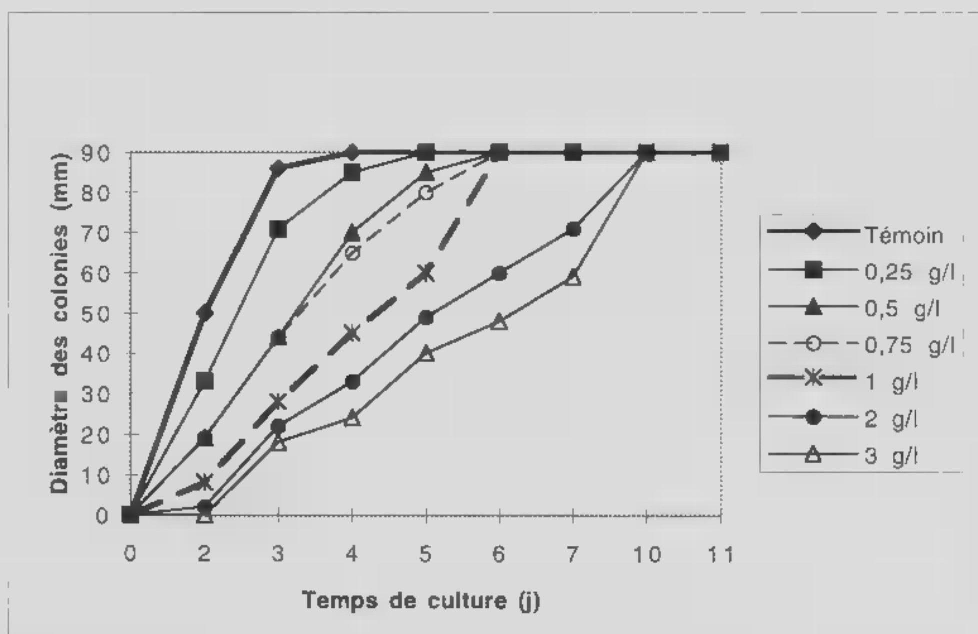


Fig. 1. — Croissance de *Trichoderma viride* sur le milieu solide en présence de différentes concentrations de B48.

Fig. 1. — Growth of *Trichoderma viride* on solid medium with variable concentrations of B48.

Les essais préliminaires de sensibilité de *Gliocladium virens* et *Trichoderma viride* vis à vis de B48 et JB75 réalisés sur milieu solide, montrent que ces deux micromycètes sont capables de se développer jusqu'à 3 g/l de B48, le plus résistant étant *T. viride* qui est capable d'envahir la boîte de Pétri en 10 jours lorsque le milieu contient 3 g/l de B48 contre 4 jours pour la culture témoin (Fig. 1). Pour *G. virens* avec la même dose de produit, on obtient une colonie mais qui n'arrive pas à envahir la boîte et dont le développement devient stationnaire à 6 jours. Donc à une dose correspondant à 3 fois celle préconisée, ce produit semble peu efficace. JB75 semble donner des résultats plus cohérents avec les doses efficaces annoncées par le fabricant. En effet, *T. viride* est totalement inhibé par ce produit à la concentration de 20 g/l. À cette dose, la croissance de *G. virens* est fortement ralentie pour devenir nulle à 30 g/l (Fig. 2).

Les études en microplaques (milieu liquide) permettent de déterminer la CMI et CML de chaque produit pour chaque espèce fongique. Dans ces essais, l'ensemencement initial est moins massif que précédement et il s'agit de spores, les conditions sont donc plus proches de la réalité.

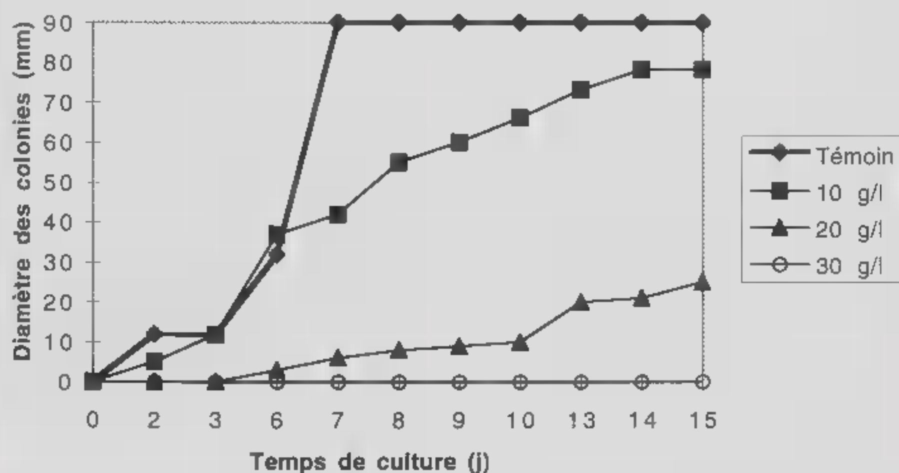


Fig. 2. — Croissance de *Glyocladium virens* sur milieu solide en présence de différentes concentrations de JB75.

Fig. 2. — Growth of *Gliocladium virens* on solid medium with variable concentrations of JB75.

Le PEG a un effet inhibiteur très net sur certaines des espèces étudiées (Fig 3), par contre ce produit n'a pas d'effet fongicide propre. Il a déjà été signalé que les PEG sous forme stable (non dégradée) n'ont pas de propriétés biocides effectives bien qu'ils empêchent le développement bactérien. Cet effet est supposé résulter d'un phénomène de compétition avec l'eau et les nutriments. Par contre, sous l'influence de rayonnements (UV, gamma...) ou en présence de traces de certains ions métalliques, les PEG peuvent se décomposer en différents produits (aldéhydes...) qui pourraient avoir une action biostatique ou même biocide (Brownstein, 1981).

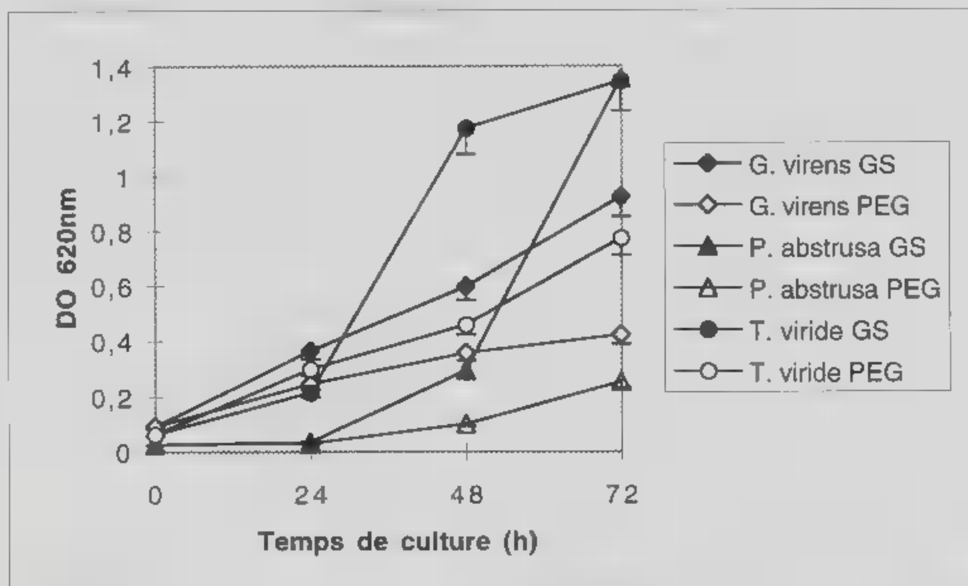


Fig. 3. — Influence du polyéthylène glycol sur la croissance des micromycètes en milieu liquide de Galzy & Slonimski (1957).
GS : milieu de Galzy et Slonimski ; PEG : milieu de Galzy et Slonimski additionné de 20 % de PEG 400.

Fig. 3. – Effect of polyethylene glycol on growth of micromycetes in liquid medium of Galzy & Slonimski (1957).
GS: Galzy & Slonimski's medium; PEG Galzy & Slonimski's medium with 20% PEG 400.

En présence des biocides, le PEG a des effets variables qui dépendent du biocide et de l'espèce fongique. Les tableaux 1 à 3 donnent les valeurs de CMI et CML obtenues. Le PCPNa est un inhibiteur très efficace entre 10 et 200 mg/l selon l'espèce (moyenne 70 mg/l). Il a une action fongicide entre 10 mg/l et 1 g/l (moyenne 250 mg/l), *Chaetomium globosum* et *Trichoderma viride* sont très résistants. Pour les autres espèces, la fourchette CMI-CML est très réduite. La présence de PEG dans le milieu de culture inhibe assez fortement l'activité du PCPNa sauf dans le cas de *Chaetomium globosum*. Les valeurs moyennes des CMI et CML sont très augmentées ainsi que l'écart entre CMI et CML

sauf pour *Chaetomium globosum et Trichoderma viride.* Le JB75 est un fongistatique efficace (CMI moyenne : 4,40 g/l), par contre les valeurs de CML sont supérieures ou égales à 50 g/l (dose maximale d'utilisation recommandée) pour plusieurs espèces. Deux espèces sont très sensibles et ne présentent que peu d'écart entre CMI et CML, ce sont *Pholiota abstrusa* et *Phialophora lignicola.* Par contre *Chaetomium globosum* est très resistant. La présence de PEG augmente la résistance (CML) de *Phialophora lignicola*, mais n'a aucun effet sur le comportement des autres espèces vis à vis de JB75. Luxor se montre un fongistatique et un fongicide efficace, on note cependant une CML élevée pour *Chaetomium globosum* et *Penicillium chrysogenum*, et globalement il y a un écart non négligeable entre les CMI et les CML. Le PEG a un effet variable, diminuant les CML pour *Pholiota abstrusa, Gliocladium virens* et *Phialophora lignicola*, tandis qu'il protège *Trichoderma viride.* Le Kathon CG, le B48 et le B66 donnent des résultats comparables ce qui est logique puisqu'ils contiennent le même type de principes actifs. Ces produits sont efficaces aussi bien comme fongistatiques que comme fongicides et on observe un écart réduit entre CMI et CML. Cependant les doses efficaces sont souvent supérieures à celles préconisées par le fabricant et *Chaetomium globosum* se montre très résistant. La présence de PEG entraine une diminution de la CML pour *Acremonium persicinum, Pholiota abstrusa* et *Penicillium chrysogenum* avec B48, pour *Acremonium persicinum* et *Gliocladium virens* avec B66 et pour *Gliocladium virens* et Phialophora lignicola avec Kathon CG. Par contre, le PEG augmente la résistance de *Gliocladium virens* vis à vis de B48 et celle de *Penicillium chrysogenum* avec Kathon CG.

En conclusion, sur les 5 solutions biocides commerciales testées 4 se révèlent des fongistatiques et fongicides efficaces ; cependant le plus performant reste le PCPNa choisi comme référence tandis que le JB75 est surtout un fongistatique. Les petites différences observées entre les 3 produits à base d'isothiazolines (B48, B66 et Kathon CG) peuvent être attribuées à une différence de structure du principe actif, la présence d'adjuvants différents ou bien à une différence de dosage pour Kathon CG et B48. Toutefois, dans ce dernier cas, l'activité est peu modifiée alors que Kathon CG est dosé au 1/10 par rapport à B48. Ceci est intéressant au plan des problèmes de toxicité, donc de retraitement et d'élimination des résidus.

Malgré ses performances, plusieurs éléments sont en défaveur du PCPNa : sa toxicité et une inhibition très nette de son activité en présence de PEG. L'interférence du PEG se produit de façon beaucoup moins systématique avec les autres biocides.

Il est important d'établir le plus précisément possible un inventaire de la microflore (algues, bactéries, micromycètes) pour choisir le ou les biocides les mieux adaptés et les doses à utiliser car certaines espèces fongiques peuvent se montrer très résistantes aux traitements ; par exemple *Chaetomium globosum* avec tous les produits ou encore *Penicillium chrysogenum* et *Phialophora lignicola* avec Luxor. De plus, ce choix doit aussi tenir compte des autres traitements infligés au pièces de bois ; en particulier l'emploi de PEG qui peut avoir aussi bien un effet bénéfique que néfaste selon les espèces fongiques et le biocide utilisé.

	JB75		JB75 PEG		PCPNa		PCPNa PEG	
	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML
Ascomycète								
Chaetomium globosum	1,0	> 60,0	1,0	> 60,0	0,20	1,0	0,75	0,75
Basidiomycète								
Pholiota abstrusa	1,0	1,0	1,0	1,0	0,10	0,10	0,20	0,30
Deutéromycètes								
Acremonium persicinum	3,0	5,0	1,0	5,0	0,01	0,01	0,20	0,50
Gliocladium virens	5,0	60,0	10,0	60,0	0,10	0,10	0,05	3,0
Penicillium chrysogenum	10,0	50,0	10,0	40,0	0,02	0,02	0,20	0,20
Phialophora lignicola	1,0	1,0	5,0	60,0	0,01	0,01	0,30	3,0
Trichoderma viride	10,0	60,0	25,0	60,0	0,05	0,50	0,75	1,0
VALEURS MOYENNES	4,40	33,85	7,60	40,85	0,07	0,25	0,35	1,25

Tableau 1. — Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales létales (CML) de JB75 et PCPNa (en g/l) sur 7 espèces fongiques cibles cultivées en milieu liquide de Galzy & Slonimski (1957) avec et sans polyethylène glycol pendant 72 h à 22° C.

Table 1. – Minimal inhibitory concentrations (CMI) and minimal lethal concentrations (CML) of JB75 and PCPNa (g/l) on 7 fungal species cultivated in liquid medium of Galzy & Slonimsky (1957) with or without polyethylene glycol during 72 h at 22° C.

	Kathon		Kathon PEG		Luxor		Luxor [redacted]	
	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML
Ascomycète								
Chaetomium globosum	0,05	3,0	0,10	3,0	0,05	> 3,0	0,10	> 3,0
Basidiomycète								
Pholiota abstrusa	0,01	0,05	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01*	0,01
Deutéromycètes								
Acremonium persicinum	0,10	0,20	0,01	0,30	0,10	0,20	0,01	0,20
Gliocladium virens	0,50	0,75	0,01	0,20	0,20	0,50	0,01	0,10
Penicillium chrysogenum	0,30	0,30	0,20	0,75	0,20	3,0	0,30	3,0
Phialophora lignicola	0,10	0,10	0,01	0,05	0,05	3,0	0,01	0,30
Trichoderma viride	0,30	0,30	0,05	0,30	0,30	0,50	0,01	0,75
VALEURS MOYENNES	0,20	0,70	0,05	0,70	0,15	1,45	0,06	1,0

Tableau 2. — Concentration minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales létales (CML) de Kathon CG et Luxor D2 (en g/l) sur 7 espèces fongiques cibles cultivées en milieu liquide de Galzy & Slonimski (1957) avec et sans polyethylène glycol pendant 72 h à 22° C;

Table 2 — Minimal inhibitory concentrations (CMI) and minimal lethal concentrations (CML) of Kathon CG and Luxor D2 (g/l) on 7 fungal species cultivated in liquid medium of Galzy & Slonimski (1957) with or without polyethylene glycol during 72 h at 22° C.

	B48		[redacted] PEG		B66		B66 PEG	
	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML
Ascomycète								
Chaetomium globosum	0,10	> 3,0	0,10	> 3,0	0,20	3,0	0,20	> 3,0
Basidiomycète								
Pholiota abstrusa	0,10	0,10	0,05	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10
Deutéromycètes								
Acremonium persicinum	0,20	0,20	0,05	0,05	0,10	0,10	0,05	0,05
Gliocladium virens	0,20	0,30	0,20	3,0	0,20	1,0	0,20	0,50
Penicillium chrysogenum	0,10	0,50	0,20	0,20	0,10	0,10	0,05	0,10
Phialophora lignicola	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10
Trichoderma viride	0,10	0,30	0,10	0,30	0,02	1,0	0,10	0,75
VALEURS MOYENNES	0,12	0,65	0,10	0,95	0,10	0,75	0,10	0,65

Tableau 3 — Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimamles létales (CML) de B48 et B66 (en g/l) sur 7 espèces fongiques cibles cultivées en milieu liquide de Galzy & Slonimski (1957) avec et sans polyethylène glycol pendant 72 h à 22° C.

Table 3 — Minimal inhibitory concentrations (CMI) and minimal lethal concentrations (CMI) of B48 and B66 (g/l) on 7 frugal species cultivated in liquid medium of Galzy & Slonimski (1957) with or without polyethylene glycol during 72 h at 22°C.

RÉFÉRENCES

BROWSTEIN A., 1981 — The chemistry of polyethylene glycol. *Proceedings of the ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Ottawa (Canada)*, pp. 279-286.

COOK C. & GRATTAN D.W., 1984 — A practical comparative study of treatments for waterlogged wood : part III : pretreatment solutions for freeze-drying. *Proceedings of the 2nd ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Grenoble (France)*, pp. 219-239.

DE TASSIGNY C. & GINIER-GILLET A., 1979 — La méthode par imprégnation/irradiation gamma. *Revue suisse d'art et d'archéologie* 36 : 138-141.

GINIER-GILLET A., PARCHAS D., RAMIERE R. & TRAN Q.K., 1984 — Méthodes de conservation développées au centre d'étude et de traitement des bois gorgés d'eau (Grenoble — France) : imprégnation par une résine radiodurcissable et lyophilisation. *Proceedings of the 2nd ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Grenoble (France)*, pp. 125-137.

HOFFMANN P., 1984 — On the stabilization of waterlogged oakwood with PEG molecular size versus degree of degradation. *Proceedings of the 2nd ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Grenoble (France)*, pp. 95-115.

JANNIERE G. & MEURGUES G., 1984 — Traitement des bois gorgés d'eau par la technique de lyophilisation au Muséum d'Histoire Naturelle. *Proceedings of the 2nd ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Grenoble (France)*, pp. 175-179.

POINTING S.B., JONES A.M. & JONES E.B.G., 1994 — The potential use of gamma irradiation for improving the long term storage of waterlogged archeological wood. *Proceedings of the 5th ICOM Group on Wet Organic Archeological Materials Conference, Portland (USA)*, pp. 437-451.

YOUNG G.S. & WAINWRIGHT I.N.M., 1982 — Polyethylene glycol treatments for waterlogged wood at the cell level. *Proceedings of the ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Ottawa (Canada)*, pp. 107-116.

PRESERVATION OF FUNGI

C.S. TAN

Centraalbureau voor Schimmelcultures,
P.O. Box 273, 3740 AG, Baarn,
The Netherlands,
fax 00 355416142; e-mail CST@CBS.KNAW.NL

SUMMARY: Dehydration of cells, necessary to avoid intra-cellular crystallization during freezing, is regulated through the cooling rate and depends on the size of the cell and the thickness of the cell-wall. Saccharides prevent phase transitions in the membrane from the liquid-crystalline to the gel-phase during dehydration. Proteins are protected against denaturation during slow cooling by saccharides and amino-acids. During freeze-drying, cells are dehydrated in the cooling step preceding drying; during drying the protectant is converted in a glass. Cryoprotectants such as glycerol, dimethylsulfoxide, 1.2 propane-diol, ethylene-glycol, ethanol, methanol, polyethylene-glycol and several butane-diols serve to avoid extra - and intracellular crystallization, but most of them are toxic. Revival in 1.2 M sucrose is recommended.

KEYWORDS: fungi, cryopreservation, lyophilization

Fungi can be preserved by various methods: on agar, under mineral oil, at ultralow-temperature and lyophilized. The latter two methods (long-term preservation) are the least laborious because metabolism is arrested and negative effects of degeneration and infection are minimized.

Cooling

The cooling rate is a critical parameter in both long-term preservation methods. When cells are cooled rapidly, intra-cellular ice-crystals are produced, which is often lethal. Production of intracellular crystals can be avoided by slow cooling (Morris, 1981). At slow cooling rates the bulk of extracellular water crystallizes in pure ice-crystals leaving a highly concentrated eutectic solution. Osmotic equilibrium between this solution and the cell is maintained by cell shrinkage. Consequently the cytoplasm becomes increasingly concentrated resulting in a depression of the freezing temperature (Fig. 1). At the optimal cooling rate cells are frozen at a rate that intracellular freezing is just avoided completely. This cooling rate depends on the size of the cell and the thickness of the cell-wall and can be monitored with a cryo-microscope (Mazur, 1984; Tan *et al.*, 1994).

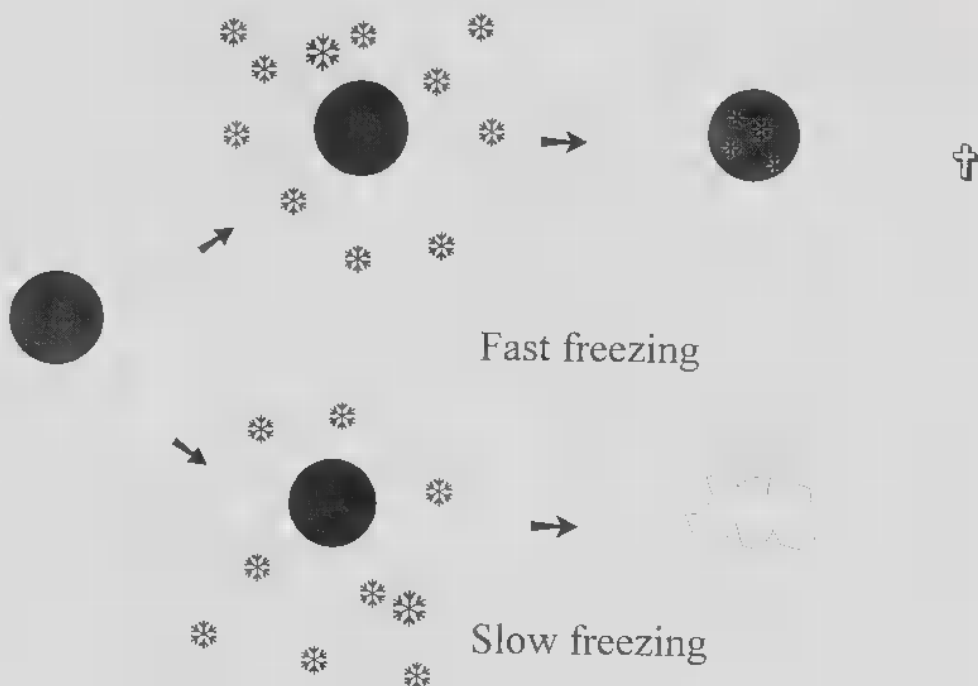


Fig. 1. — Influence of the cooling rate on cells.

Freeze-drying

Lyoprotectant:

During freeze-drying, cells are suspended in a lyoprotectant. A lyoprotectant includes a macromolecule, which serves as a bulking agent, and a saccharide. In a fluid (liquid-crystalline) membrane, water is hydrogen-bonded to the phospholipid head groups, yielding space for the fatty-acid acyl chains to be mobile. During desiccation a phase transition occurs in the membrane from the liquid-crystalline to the gel phase, which causes leakage of the membrane and therefore will result in cell damage. Saccharides protect membranes during freezing and drying (Crowe *et al.*, 1984, 1987, 1990) against this transition by hydrogen-bonding to the phospholipid head groups thus replacing water (Crowe *et al.*, 1985a). This interaction increases head group spacing, resulting in a lower transition temperature of the phospholipids (Crowe *et al.*, 1985b) (Fig.2). Disaccharides are found to be optimal, particularly trehalose (Fig. 3) (Crowe *et al.*, 1984; Tan *et al.*, 1995). Trehalose is produced in spores and conidia of yeasts and fungi to protect their membranes and proteins at the low moisture content present in these propagules (Thevelein, 1984; Wiemken, 1990).

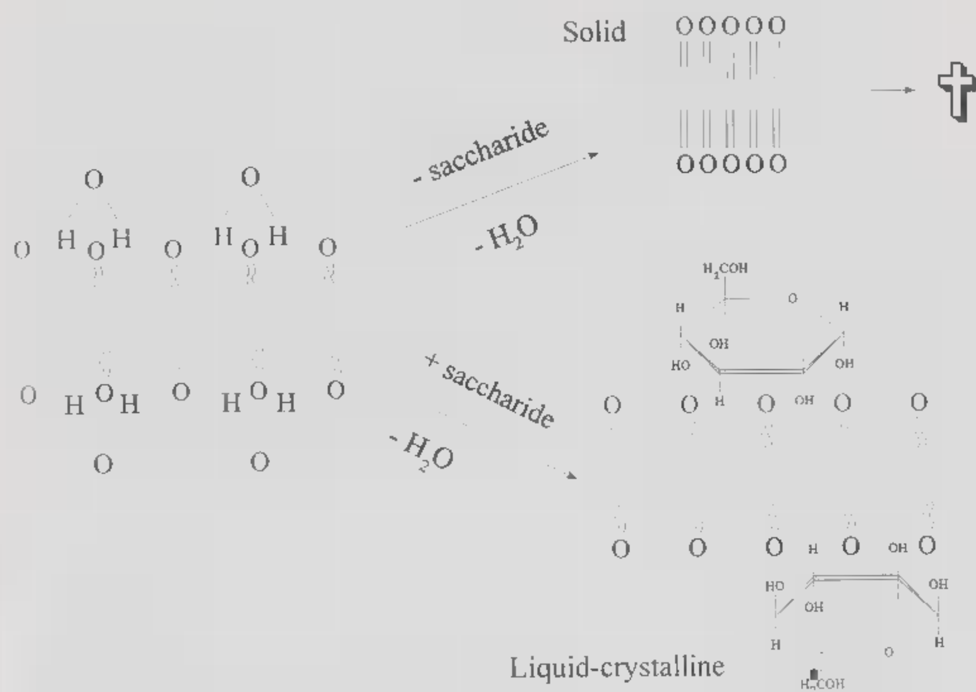


Fig. 2. — Prevention of phase-transition of the membrane during dehydration by saccharides.

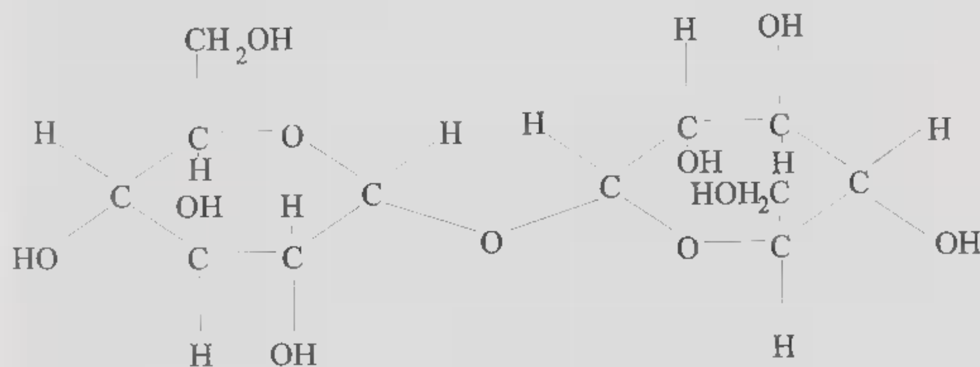


Fig. 3. — Structure formula of trehalose.

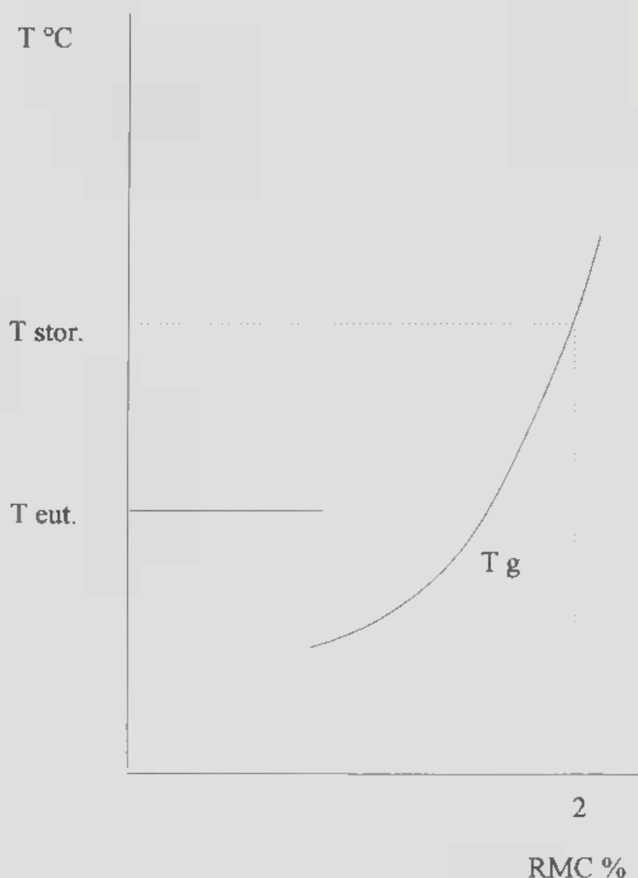


Fig. 4. — Phase-diagram of solution during freeze-drying.

As a result of freeze-concentration during slow cooling, proteins unfold and hence denaturate. They can be protected against this denaturation by saccharides and amino-acids. Proteins are stabilized because both type of compounds are preferentially excluded (Arakawa & Timasheff, 1982; Back *et al.*, 1979; Carpenter & Crowe, 1988) from the surface of the protein in aqueous solution. They repel the hydrophobic parts of the amino acid chains, thus preventing unfolding of the protein. Moreover, hydrogen bonding between the saccharide and the protein in the final stages of desiccation is required for stabilization of the dried proteins (Carpenter & Crowe, 1988; Carpenter *et al.*, 1991).

Freeze-drying protocol:

In the cooling step preceding drying the bulk of extracellular water crystallizes and the cells are dehydrated. After cooling the dehydrated cells, surrounded by the highly

viscose lyoprotectant are embedded in ice-crystals. At the temperature of the primary drying phase, viscosity of the lyoprotectant is so high that it is a glass. A glass is a liquid in which the molecules are immobilized (Franks, 1990). In the primary drying phase the ice-crystals evaporate, leaving a glass interwoven with channels. During secondary drying water evaporates through these channels from the glass, making it even more viscose. Because the viscosity increases, the temperature at which the glass is stable increases. By slowly raising the temperature, evaporation of water from the glass is enhanced. Finally so much water is evaporated that the protectant is a stable glass at room temperature (Fig.4). A glass is an ideal formulation to store dehydrated organisms because they are protected against outside enzyme and chemical activity and the molecules of the lyoprotectant are arranged in an unordered structure, allowing binding to the membranes and the proteins. The temperature-regime, that must be applied to prevent collapse of the glass during freeze-drying, can be established with a freeze-drying microscope.

Freeze-dried organisms can be stored successfully below the glass-transition temperature (Tg) (Franks, 1990). Tg is the temperature at which the glass melts during warming. Above Tg, water mobility increases and consequently the product deteriorates. The Tg is determined by the composition of the protectant and the residual moisture content and can be estimated by differential scanning calorimetry (DSC) (Hatley, 1990).

Cryopreservation

Freeze-drying has two advantages over cryopreservation. No special requirements are needed to store the product and its despatch does not need cooling facilities. However, viability is much higher for cryopreservation and sterile mycelia can generally not be freeze-dried. During cryopreservation, cells are suspended in a cryoprotectant. Cryoprotectants have a high glass-forming tendency and the glasses produced are rather stable (Mehl & Boutron, 1987; Boutron *et al.*, 1986). They partly penetrate the cells where they prevent or reduce growth of intra-cellular ice-crystals. Because not all the protectant penetrates the cell, they stimulate cell shrinkage and hence lower the freezing temperature of the cellular contents. Finally they reduce growth of ice-crystals in the medium. Commonly used cryoprotectants are glycerol, dimethylsulfoxide, 1.2 propane-diol, ethylene-glycol, ethanol or methanol. Other solutions having a high glass-forming tendency are poly-ethylene-glycol, 1.2 butane-diol, 1.3 butane-diol and 2.3 butane-diol (Mehl & Boutron, 1987; Boutron *et al.*, 1986) but they are quite toxic. It is advisable to estimate the time required for permeation of the cryoprotectant into the cell by cryomicroscopy, and in relation to this and the size of the cell and the thickness of the cell-wall, the optimal cooling rate. Moreover, since most cryoprotectants are more or less deleterious, toxicity must be established to determine the period and temperature of handling prior to storage at ultra-low temperature. Organisms can best be stored below -135°C to completely stop the growth of ice-crystals (Morris, 1981). When stored at a higher temperature, the product must be kept below the Tg of the protectant.

Revival

Revival is an important issue in both long-term preservation methods because sublethal damage on membranes and proteins can never be avoided completely. Cells can be revived in water or transferred immediately onto the suitable agar-medium. However, when survival rates are low, it is recommended to revive cells in 1.2 M sucrose to dilute the toxic protectant and to stimulate efflux of the protectant from the cell while minimizing

osmotic expansion (Tan & Stalpers, 1996). Optionally amino-acids may be added to the revival medium to repair denaturated proteins and to restore the energy charge.

Storage under mineral oil

When neither technicians nor equipment are available for maintenance of fungal cultures, storage under mineral oil is a cheap and less elaborative alternative (Fennel, 1960). Cultures, growing on an agar slant are covered by paraffine oil (Paraffinum perliquidum 60-80 (mPa.s = 1 cP), Brocacef B.V., Maarssen, The Netherlands). Oxygen entrance to the cultures, and hence metabolism is retarded to approximately 10%. When stored at 10°C and at a relative humidity of 70%, ascomycetes, basidiomycetes and zygomycetes have to be transferred only once in ten years. Oomycetes must be transferred every two years when stored under these conditions.

REFERENCES

ARAKAWA T. & TIMASHEFF S.N., 1982 — Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry* 21: 6536-6544.

BACK J.F., OAKENFULL D. & SMITH M.B., 1979 — Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18: 5191-5196.

BOUTRON P., MEHL P., KAUFMANN A. & ANGIBAUD P., 1986 — Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons I. Binary systems water-polyalcohol. *Cryobiology* 23: 453-469.

CARPENTER J.F. & CROWE J.H., 1988 — Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. *Cryobiology* 25: 459-470.

CARPENTER J.F., ARAKAWA T. & CROWE J.H., 1991 — Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *Development biological standardization* 74: 225-239.

CROWE J.H., CROWE L.M. & CHAPMAN D., 1984 — Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science* 223: 701-703.

CROWE J.H., CROWE L.M., CARPENTER J.F. & WISTROM C.A., 1987 — Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical journal* 242: 1-10.

CROWE J.H., CARPENTER J.F., CROWE L.M. & ANCHORDOGUY T.J., 1990 — Are freezing and dehydration similar stress vectors ? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27: 219-231.

CROWE L.M., CROWE J.H. & CHAPMAN D., 1985 — Interaction of carbohydrates with dry dipalmitoylphosphatidylcholine. *Archives of biochemistry and biophysics* 236: 289-296.

CROWE L.M., CROWE J.H., RUDOLPH A., WOMERSLEY C. & APPEL L., 1985 — Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Archives of biochemistry and biophysics* 242: 240-247.

FENNELL D.I., 1960 — Conservation of fungous cultures. *Botanical review* 26: 79-141.

FRANKS F., 1990 — Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions. *Development biological standardization* 74: 9-19.

HATLEY R.H.M., 1990 — The effective use of differential scanning calorimetry in the optimisation of freeze-drying processes and formulations. *Development biological standardization* 74: 105-122.

MAZUR P., 1984 — Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology* 247: C125-C142.

MEHL P. & BOUTRON P., 1987 — Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous state of linear polyalcohols with four carbons II. Ternary systems with water, 1.2-propanediol or 1.3-butanediol or 2.3-butanediol. *Cryobiology* 24: 355-367.

MORRIS G.J. (ed.), 1981 — *Cryopreservation. An introduction to cryopreservation in culture collections*. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge, United Kingdom.

TAN C.S., VLUG IJ.A., STALPERS J.A. & INGEN C.W. van, 1994 — Microscopical observations on the influence of the cooling rate during freeze-drying of spores. *Mycologia* 86: 281-289.

TAN C.S., INGEN C.W. van, TALSMA H., MILTENBURG J.C. van, STEFFENSEN C.L., VLUG IJ.A. & STALPERS J.A., 1995 — Freeze-drying of fungi: influence of composition and glass transition temperature of the protectant. *Cryobiology* 32: 60-67.

TAN C.S. & STALPERS J.A., 1996 — Vitrification of fungi. *In*: Biodiversity. International biodiversity seminar ECCO XIV. meeting. Ed. A. Cimerman & N. Gunde-Cimerman, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia, pp. 189-193.

THEVELEIN J.M., 1984 — Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological reviews* 48: 42-59.

WIEMKEN A., 1990 — Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek journal of microbiology and serology* 58: 209-217.

ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE D'HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES AU BÉNIN ET AU TOGO

F. BABA-MOUSSA *, K. KOUMAGLO **, A. AYEDOUN ***, K. AKPAGANA **, M. MOUDACHIROU ***, P. BOUCHET *.

* U.F.R. de Pharmacie, Université de Reims,
51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France.
** Faculté des Sciences, Université du Bénin,
B.P. 1515, Lomé, Togo
***Département de Chimie,
Faculté des Sciences,
Université Nationale du Bénin,
Calavi, Bénin.

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes supérieures pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques est une pratique très ancienne en thérapeutique. Ces propriétés s'expriment à travers diverses composantes de la plante, parmis lesquelles figurent les huiles essentielles.

L'activité antifongique des huiles essentielles a fait l'objet de plusieurs travaux (Chaumont *et al.*, 1959 ; Misra *et al.*, 1988 ; Oloke, 1992 ; Singh *et al.*, 1992).

Notre étude concerne les huiles essentielles extraites de douze espèces végétales appartenant à huit familles différentes récoltées à différentes périodes et dans diverses régions du TOGO et du BENIN.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les huiles essentielles ont été extraites des espèces suivantes :

Cymbopogon citratus (F), Cymbopogon giganteus (F), Cymbopogon shoenanthus (F), Eucalyptus citriodora (F), Fagara xanthoxyloides (Fr), Lippia multiflora (F), Melaleuca quinquenervia (F), Ocimum canum (F), Ocimum gatissimum (F), Pimenta racemosa (F), Steganotenia araliacea (F), Xylopia aethiopica (Fr).

Elles ont été essayées sur cinq souches de champignons sélectionnés parmis des espèces contaminantes (*Aspergillus flavus* et *Trichoderma harzianum*), des espèces phytopatogènes (*Botrytis cinerea*) et des espèces anthropo-pathogènes (*Candida albicans, Microsporum gypseum*).

L'extraction des huiles essentielles à été réalisée par la technique d'hydrodistillation dans un appareil de type CLEVENGER.

Réalisation des tests antifongiques :

La recherche de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des huiles essentielles à été effectuée par une technique de dilution en milieu liquide sur plaque Nunc® de 24 puits.

Chaque puits reçoit 900 µl de milieu liquide de SABOURAUD, 50 µl d'huile essentielle, 50 µl d'une suspension de spores calibrée à 4×10^3 UFC/ml (champignons filamenteux) et 4×10^5 UFC/ml (*Candida albicans*). Les concentrations finales en huiles essentielles sont comprises entre 312 ppm et 10 000 ppm.

Une plaque ne contenant que les témoins est réalisée à part, pour éviter une interférence de la fraction volatile des huiles essentielles sur la croissance des témoins.

La croissance des champignons est observée dans les différents puits après incubation à 25° C, sous agitation.

L'évaluation de l'activité antifongique de la fraction volatile (QMI ou Quantité Minimale Inhibitrice) est effectuée par la technique des microatmosphères en milieu solide de Kellner & Kober (1954).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La plupart des huiles essentielles inhibent la croissance des champignons avec des CMI comprises entre 312 ppm et 10 000 ppm.(Tableau I). Celles de *Cymbopogon citratus*, d'*Eucalyptus citriodora*, de *Lippia multiflora* et d'*Ocimum gratissimum* sont actives sur toutes les espèces fongiques étudiées. L'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*, particulièrement active, inhibe la croissance de *Botrytis cinerea*, *Candida albicans* et de *Microsporum gypseum* à la concentration de 312 ppm.

En revanche, celle de *Fagara xanthoxyloides* ne présente aucune activité inhibitrice.

En ce qui concerne l'activité inhibitrice de la phase volatle des H.E., les quantités minimales inhibitrices varient de 5 µl à 15 µl.

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles ne varie pas sensiblement quelle que soit la technique utilisée : l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* est la plus active, suivie de celles de *Lippia multiflora*, d'*Ocimum gratissimum* et d'*Eucalyptus citriodora*. Cette concordance des résultats peut s'expliquer par le fait que l'activité des huiles essentielles est surtout due à leurs constituants volatils.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

À l'exception de l'huile essentielle de *Lippia multiflora* peu étudiée jusqu'à présent et qui ▪ donné ici de bons résultats, la plupart des huiles essentielles évoquées dans cette étude, ont fait l'objet de plusieurs travaux (Janssen *et al.*, 1989 ; Thomas, 1989 ; Lima *et al.*, 1993 ; Kishore *et al.*, 1993). Les substances responsables de l'activité antifongique de certaines de ces huiles essentielles sont connues : il s'agit essentiellement de l'alpha alpha- et du bêta-citral pour *Cymbopogon citratus* (Hmamouchi, 1990 ; Wannissorn, 1996), du citronellol et du citronellal pour *Eucalyptus citriodora* (Oloke, 1992), du thymol pour *Ocimum gratissimum* (Onawumi, 1989).

Notre étude confirme bien les propriétés antifongiques de ces produits. Ceux-ci faciles à obtenir artisanalement au TOGO et au BENIN, pourraient être avantageusement utilisés comme conservateurs, comme antiseptiques en cosmétologie (Sofowora, 1981 ; Wannissorn, 1996) ou dans le traitement des mycoses humaines et animales.

Champignons / Huiles essentielles	*Aspergillus flavus* FPR 023	*Candida albicans* IP 4872	*Microsporum gypseum* IP 137	*Trichoderma harzianum* MNHN 3416	*Botrytis cinerea* RA3
Cymbopogon citratus	2500	312	312	2500	312
Cymbopogon giganteus	>10000	>10000	2500	>10000	5000
Cymbopogon schoenanthus	>10000	1250	312	2500	>10000
Eucalyptus citriodora	10000	1250	312	5000	625
Fagara xanthoxyloides	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Lippia multiflora	2500	625	312	5000	625
Melaleuca quinquenervia	>10000	>10000	10000	>10000	625
Ocimum canum	>10000	>10000	10000	>10000	>10000
Ocimum gratissimun	2500	625	312	2500	625
Pimenta racemosa	2500	5000	625	2500	625
Steganotenia araliacea	>10000	>10000	5000	>10000	5000
Xylopia aethiopica	>10000	>10000	5000	>10000	2500

Tableau I. — CMI des huiles essentielles en ppm après 48 h et onze jours d'incubation.

Champignons / Huiles essentielles	*Aspergillus flavus* FPR 023	*Candida albicans* IP 4872	*Microsporum gypseum* IP 137	*Trichoderma harzianum* MNHN3416	*Botrytis cinerea* RA3
Cymbopogon citratus	15	5	5	5	5
Cymbopogon giganteus	>15	15	5	>15	15
Cymbopogon schoenanthus	>15	>15	15	>15	15
Eucalyptus citriodora	15	15	5	15	>15
Fagara xanthoxyloides	>15	>15	>15	>15	>15
Lippia multiflora	15	5	5	>15	5
Melaleuca quinquenervia	>15	>15	5	>15	>15
Ocimum canum	>15	>15	5	>15	15
Ocimum gratissimun	15	15	5	15	5
Pimenta racemosa	>15	>15	5	>15	>15
Steganotenia araliacea	>15	15	5	>15	15
Xylopia aethiopica	>15	>15	5	>15	>15

Tableau II. — CMI des huiles essentielles en µl après 48 h et onze jours d'incubation

BIBLIOGRAPHIE

CHAUMONT J.P. & BARDEY I., 1989 — Activité antifongique *in vitro* de sept huiles essentielles. *Fitoterapia* 60(3) : 263-266.

HMAMOUCHI M., TANTAOUI-ELARAKI A., ES-SAFI N. & AGOUMI A., 1990 — Mise en évidence des propriétés antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles d'*Eucalyptus. Plantes medicinales et phytothérapie* 24(4) : 278-289.

JANSSEN A.K., SCHEFFER J.J.C., NTEZURUBANZA L. & BAERHEIM SVENDSEN, 1989 — Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda. *Journal of ethnopharmacology* 26 : 57-63.

KELLNER W. & KOBER W., 1954 — Moglichkeiten des Werwendung atherischer Öle zur raum Desinfektion. *Arzeim Forschung* 4 : 419.

KISHORE N., MISHRA A.K. & CHANSOURIA J.P. N., 1993 — Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses* 36 : 211-215.

LIMA E.O., GOMPERTZ O.F., GIESBRECHT A.M. & PAULO M.Q., 1993 — *In vitro* antifungal activity of essential oil obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses* 36 : 333-336.

MISRA N., BATRA S. & MISHRA D., 1988 — Fungitoxic properties of the essential oil of *Citrus limon* (L.) Burm. against a few dermatophytes. *Mycoses* 31(7) : 380-382.

OLOKE J.K., 1992 — Fungicidal effects of the volatile oil of *Aframomum melegueta*. *Fitoterapia* 63(3) : 269-270.

ONAWUMI O.G., 1989 — Evaluation of antifungal activity of lemon grass oil. *International journal of crude drug research* 27(2) : 121-126.

SINGH S.P., NEGI S., LAXMI C. & SINGH A.K., 1992 — Antibacterial and antifungal activities of *Mentha arvensis* essential oil. *Fitoterapia* 63(1) : 76-78.

SOFOWORA E.A., 1981 — *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*. John Wiley and Sons Lmt. New York, p. 71.

THOMAS O.O. 1989 — Re-examination of the antimicrobial activity of *Xylopia aethiopica, Carica papaya, Ocimum gratissimum* and *Jatropha curcas*. *Fitoterapia* 60(2) : 147-157.

WANNISSORN B., JARIKASEM S. & SOONTORNTANASART T., 1996 — Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream. *Phytotherapy research* 10 : 551-554.

Cryptogamie, Mycol. 1997 18 (2) : 169-171

ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES D'EXTRAITS LICHENIQUES

HALAMA P. (1) et VAN HALUWYN C. (2).

(1) : Institut Supérieur d'Agriculture, 41 rue du Port, 59046 Lille cedex.
(2) : Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, 59006 Lille cedex.

Des travaux antérieurs ont mis en évidence des activités allélopathiques (Henningsson & Lundstrom, 1970 ; Gonzales *et al.*, 1991...), antiherbivores (Slansky, 1979 ; Hätscher *et al.*, 1991), antibactériennes (Vartia, 1950, 1973 ; Rowe *et al.*, 1989...) et antifongiques (Burzlaff, 1950 ; Henningsson & Lundstrom, 1970...) d'extraits lichéniques voire d'acides lichéniques (Gonzalez *et al.*, 1991 ; Lawrey *et al.*, 1994...).

Dans un objectif de recherche de composés antifongiques vis-à-vis d'espèces fongiques phytopathogènes, nous avons testé des extraits acétoniques de 3 espèces lichéniques : *Evernia prunastri, Hypogymnia physodes* et *Cladonia portentosa*. Les tests ont été réalisés sur la croissance mycélienne *in vitro* de 8 espèces fongiques : *Pythium ultimum, Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Colletotrichum lindemuthianum, Fusarium solani, Stagonospora nodorum* et *Ustilago maydis*. Un autre test a été réalisé sur la germination des spores de *S. nodorum, C. lindemuthianum* et *F. solani*.

Les extraits acétoniques ont été préparés par une macération (12h) des lichens broyés (200mg/ml d'acétone) puis incorporation au milieu gélosé (V8 ou PDA) de 50 µl d'extrait/ ml de milieu (ph 5.6).

Parmi les espèces lichéniques *E. prunastri* et *H. physodes* présentent les principales activités antifongiques (tableau 1). Ces dernières ont été détectées vis-à-vis de *P. ultimum, P. infestans* et *U. maydis*. On peut remarquer une certaine spécificité d'action, dans la mesure où *P. ultimum* et *P. infestans* appartiennent aux Phycomycètes.

Parmi les 3 espèces fongiques, une inhibition totale de la croissance mycélienne fut observée pour *P. ultimum* et *U. maydis*, et une très forte inhibition pour *P. infestans*. Des études complémentaires révélèrent un effet fongicide d'*E. prunastri* sur *P. ultimum* et *U. maydis*, et pour *H. physodes* sur *P. ultimum* alors qu'un effet fongistatique d'*H. physodes* fut mis en évidence vis-à-vis d' *U. maydis*.

Des activités faibles ont été observées sur la germination des spores.

Dans la mesure où la chimie des lichens est relativement bien connue à des fins taxonomiques, cette étude devrait se poursuivre par l'expérimentation des acides lichéniques présents chez les lichens testés afin de préciser les composés actifs. En effet, *E. prunastri* est caractérisé par la présence d'acide évernique, d'acide usnique, d'atranorine et de chloroatranorine. Ces deux derniers composés sont également rencontrés chez *H. physodes* ainsi que l'acide physodique et physodalique. *C. portentosa* ne renferme que de l'acide usnique.

Espèces fongiques	Lichen	Diamètre moyen (cm) des colonies et % par rapport au témoin (entre parenthèses) au jour d'incubation (j)				
		1 j	2 j	4 j	8 j	10 j
	EVE	0	0	-	-	-
Pythium ultimum	HYP	0	0	-	-	-
	CLA	3.98** (86)	6.89** (86.1)	-	-	-
	EVE	-	-	0.25** (7.6)	0.49** (12)	0.73** (13.4)
Phytophthora infestans	HYP	-	-	0	0	0.16** (3.6)
	CLA	-	-	0.20** (12.2)	1.16** (23.3)	1.55** (25.8)
	EVE	-	-	3.80** (57.6)	-	-
Rhizoctonia solani	HYP	-	-	3.21** (52.5)	-	-
	CLA	-	-	3.49** (57.3)	-	-
	EVE	-	-	0.86** (24.8)	2.62** (38.4)	3.93** (54.3)
Botrytis cinerea	HYP	-	-	1.73** (50)	3.62** (53)	4.76** (65.8)
	CLA	-	-	3.99** (58.6)	6.71** (83.9)	-
	EVE	-	-	1.91** (57.7)	3.84** (59)	4.63** (61.6)
Fusarium solani	HYP	-	-	0.88** (32.5)	1.59** (29.8)	1.94** (32.3)
	CLA	-	-	1.93** (70.2)	4.01** (71.1)	4.84** (72.4)
	EVE	-	-	1.51** (40.6)	3.40** (53.9)	4.20** (61.2)
Colletotrichum lindemuthianum	HYP	-	-	0.64** (18.9)	1.55** (26.8)	2.10** (34.2)
	CLA	-	-	1.20** (34.3)	2.91** (49.2)	3.92** (57.9)
	EVE	-	-	1.45** (75.1)	2.60** (65.5)	3.18** (68.2)
Stagonospora nodorum	HYP	-	-	0.97* (88.2)	1.65** (62.5)	1.74** (48.7)
	CLA	-	-	1.11** (61.3)	2.30** (59.9)	2.93** (59.7)
	EVE	-	-	0	0	0
Ustilago maydis	HYP	-	-	0	0	0
	CLA	-	-	0.41** (71.9)	0.96** (84.9)	1.17** (87.9)

* Significativement différent au seuil de 5% (test de Newman - Keuls)
** Significativement différent au seuil de 1% (test de Newman - Keuls)

Tableau 1. — Effets des extraits lichéniques d'*Evernia prunastri* (EVE), *Hypogymnia physodes* (HYP) et de *Cladonia portentosa* (CLA) sur la croissance mycelienne de 8 espèces fongiques pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

BURZLAFF D.F., 1950 — The effect of extracts from the lichen *Parmelia molliuscula* upon seed germination and upon the growth rate of the fungi. *Journal of the Colorado-Wyoming Academy of science* 4 : 56.

GONZALEZ A.G., RODRIGUES PEREZ E.M.A. & BARRERAJ B., 1991 — Biologically active coumponds from the lichen *Ramalina hierrensis. Planta medica* 57 : 1363.

HATSCHER I., VEIT M., PROKSCH P., LANGE O.L. & ZELLNER H., 1991 — Feeding deterrency and growth retarding activity of lichen substances again *Spodoptera littoralis. Planta medica* 57 : 1354.

HENNINGSSON B. & LUNDSTROM H., 1970 — The influence of lichens, lichen extracts and usnic acid on wood destroying fungi. *Material and organismen* 5 : 19-31.

LAWREY J.D., ROSMAN A.Y. & LOWEN R., 1994 — Inhibition of selected hypocrealean fungi by lichen secondary metabolites. *Mycologia* 86 : 502-506.

ROWE J.G., SAEZ M.T. & GARCIA M.D., 1989 — Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de quelques lichens du sud de l'Espagne. *Annales pharmaceutiques françaises* 47 : 89-94.

SLANSKY F., 1979 — Effect of the lichen chemicals atranorin and vulpinic acid upon feeding and growth of larvae of the yellow-striped armyworm *Spodoptera ornithogalli. Environmental entomology* 8 : 865-868.

VARTIA K.O., 1950 — Antiboitics in lichens. II. *Annales medicinae expermerimentalis et biologiae fennicae* 28 : 7-19.

VARTIA K.O., 1973 — Antibiotics in lichens. *In* : Ahmadjian V. & Hale M.E. (Ed.), The Lichens, Academic Press, New-York, pp. 547-561.

Commission paritaire 16-1-1986 - N° 58611 - Dépôt légal 3e trimestre 1997 - Imprimerie F. Paillart
Sortie des presses le 31 juillet 1997 - Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : D. Lamy ; Secrétaire : B. Dennetière
Trésorier : Mme E. Bury ; Directeur de la publication : H. Causse



Société Française de Systématique 

La Société Française de Systématique réunit les systématiciens ou les personnes intéressées par la Systématique et les informe en publiant un *Bulletin*. Elle convie ses membres à des colloques annuels transdisciplinaires, au cours desquels les systématiciens et d'autres scientifiques peuvent s'exprimer et débattre.

Cotisation annuelle: 100F

Demande d'adhésion à adresser au:
Secrétariat de la Société Française de Systématique, 45 rue Buffon, F-75005 Paris.
CCP 7-367-80 D PARIS

***La Société édite aussi la série* Biosystema.**
Prix TTC du Biosystema (France, Etranger): 150 FF, membre SFS : 100 FF.

Biosystema 1 - Introduction à la systématique zoologique - (Concepts, Principes, Méthodes) par L. Matile, P. Tassy & D. Goujet. 1987.

Biosystema 2 - Systématique Cladistique - Quelques textes fondamentaux. Glossaire. Traduction et adaptation de D. Goujet, L. Matile, P. Janvier & J.P. Hugot. 1988

Biosystema 3 - La systématique et l'évolution de Lamarck aux théoriciens modernes. par S. Løvtrup. 1988.

Biosystema 4 - L'analyse cladistique: problème et solutions heuristiques informatisées, par M. d'Udekem-Gevers. 1990.

Biosystema 5 - Les introuvables de J.B. Lamarck- Discours d'ouverture du cours de zoologie et articles du Dictionnaire d'Histoire naturelle. Edition préparée par D. Goujet. 1990.

Biosystema 6 - Systématique et Ecologie, par R. Barbault, Cl. Combes, F. Renaud, N. Le Brun & A. Dubois. Edition coordonnée par J.P. Hugot. 1991.

Biosystema 7 - Systématique et Biogéographie Historique. Textes historiques et méthodologiques. Traduction et adaptation de P. Janvier, L. Matile & Th. Bourgoin. 1991.

Biosystema 8 - Systématique et Société. Edition coordonnée par G. Pasteur. 1993.

Biosystema 9 - Les Monocotylédones, par J. Mathez. 1993.

Biosystema 10 - Systématique botanique : problèmes actuels. Edition coordonnée par O. Poncy. 1993.

Biosystema 11 - Systématique et Phylogénie: modèles d'évolution biologique. Edition coordonnée par P. Tassy et H. Lelièvre. 1994.

Biosystema 12 - Phylsyst: logiciel de reconstruction phylogénétique, par I. Bichindaritz, S. Potter & B. Sigwalt †. 1994.

Biosystema 13 - Systématique et Biodiversité. Edition coordonnée par Th. Bourgoin. 1995.

Biosystema 14 - Systématique et Informatique. Edition coordonnée par J. Lebbe, en préparation.

Le Conseil de la SFS. XII.1995

SOMMAIRE

Cryptogamie, Mycol. 1997, 18 (2) : 95-172